



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Identificación de *Culicoides spp.* como vectores del
virus Lengua Azul en áreas de ovinos seropositivos de
Pucallpa, Ucayali**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias
Veterinarias con mención en Salud Animal

AUTOR

Dennis Alexander NAVARRO MAMANI

ASESOR

Hermelinda RIVERA GERÓNIMO

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Navarro D. Identificación de *Culicoides spp.* como vectores del virus Lengua Azul en áreas de ovinos seropositivos de Pucallpa, Ucayali [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2017.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



6107
87
**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SALUD ANIMAL**

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 14:00 horas del día jueves 07 de diciembre de 2017, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Dr. Raúl Rosadio Alcántara (presidente) y constituido por los siguientes miembros: Mg. Hermelinda Rivera Gerónimo (Asesora), Mg. Abraham Germán Cáceres Lázaro, Mg. Alberto Manchego Sayán, Dr. César Gavidia Chucán, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

"Identificación de *Culicoides spp.* como vectores del virus Lengua Azul en áreas de ovinos seropositivos de Pucallpa, Ucayali" presentado por el Bachiller en Medicina Veterinaria:

DENNIS ALEXANDER NAVARRO MAMANI

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **MUY BUENO (18) DIECIOCHO**

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del **Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Salud Animal**, al Bachiller en Medicina Veterinaria: **Dennis Alexander Navarro Mamani**

Siendo las 16:30 horas del día jueves 07 de diciembre de 2017, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

.....
Dr. Raúl Héctor Rosadio Alcántara (P.P.T.C.)
Presidente

.....
Mg. Hermelinda Rivera Gerónimo (P.P.T.C.)
Miembro (Asesora)

.....
Mg. Abraham Germán Cáceres Lázaro
Miembro (Externo)

.....
Mg. Alberto Manchego Sayán (P.P.D.E.)
Miembro

.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Miembro

.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM

DEDICATORIA

Dedicó este trabajo a mi madre, María, que con su demostración de una madre ejemplar me ha enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar. A mi asesora la Dra. Hermelinda Rivera por su valiosa guía y asesoramiento, quien con su ejemplo me ha mostrado la dedicación y pasión por el trabajo que uno realiza

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, al Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Sección Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, lugar donde se ejecutó y planificó el presente trabajo. En sentido especial, a la Mg. MV. Hermelinda Rivera Gerónimo, quien me asesoró en la ejecución de este trabajo de investigación.

Al Instituto Veterinario de Investigaciones tropicales y de Altura Pucallpa (IVITA-PUCALLPA), donde se realizó la colecta de los insectos capturados. En sentido especial, al Mg. MV. Juan Alexander Rondon Espinoza, quien me contacto con las granjas y coordinó los muestreos.

Al Mg. Blgo. Abraham Germán Cáceres Lázaro, quien brindo su gentil colaboración en el diseño del proyecto y en la identificación de especies de *Culicoides* spp. capturados al igual que el Instituto de Ecología A.C (INECOL), Xalapa, Veracruz-México. Lugar donde realicé una estancia para la capacitación en sistematización de *Culicoides* spp. En especial al Dr. Sergio Ibáñez Bernal, quien estuvo dispuesto a aceptarme en el departamento de Entomología del INECOL, y me capacitó en la identificación de *Culicoides* spp.

Laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Inmunología, Mg. MV. Alberto Manchego Sayán y PhD. Miguel Rojas Montes, quienes me asesoraron en el diseño de cebadores y en la estandarización de la prueba de PCR y PCR anidado.

Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Sección Parasitología, ya que me permitió el uso de sus equipos para la identificación de *Culicoides* spp. En especial, a la Mg. MV. Amanda Cristiana Chávez Velásquez de García, siempre dispuesta a apoyarme.

INDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE ANEXOS	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1.IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN OVINA EN EL PERÚ	4
2.GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>Culicoides</i> spp.	6
3.TAXONOMÍA	6
4.MORFOLOGÍA	7
4.1 Huevo	7
4.2 Larva.....	7
4.3 Pupa.....	7
4.4 Adulto.....	8
5.CICLO BIOLÓGICO.....	9
5.1 Ciclo de desarrollo.....	9
5. 2 Ciclo gonotrófico.....	10
6.HÁBITOS ALIMENTICIOS	10
7.PREFERENCIAS DE HOSPEDEROS.....	11
8.DISTRIBUCIÓN Y HÁBITATS	12
9.DINÁMICA DE <i>CULICOIDES</i>	13
10.IDENTIFICACIÓN DE MOSQUITOS DEL GÉNERO <i>Culicoides</i> spp.....	14
10.1 Cabeza:	14
10.2 Patas:	16
10.3 Abdomen.	16
10.4 Espermateca	16
10.5 Hipopigium.....	16
10.6 Alas.....	17
11.IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>Culicoides</i> spp.	17
11.1 Las nervaduras.....	17
11.2 Celdas	18
11.3 Los elementos anexos.....	19
12.PRINCIPALES ESPECIES DE <i>Culicoides</i> spp. REGISTRADAS EN LA REGIÓN NEOTROPICAL Y PERÚ.....	19

12.1 <i>Culicoides insignis</i>	19
12.2 <i>Culicoides pusillus</i>	21
12.3 <i>Culicoides paraensis</i>	21
12. 4 <i>Culicoides foxi</i>	22
13.MÉTODOS DE CAPTURA.....	24
13.1 Trampa Onderstepoort:.....	24
13. 2 Trampa mini-CDC	25
14.IMPORTANCIA DE LOS <i>Culicoides</i> spp. COMO VECTORES DE ARBOVIRUS	25
14.1 VIRUS OROPOUCHE (vORO).....	27
14.2 VIRUS DE PESTE EQUINA AFRICANA (PEA)	27
14.3 VIRUS DE SCHMALLENBERG (SBV)	27
14. 4 VIRUS DE AKABANE (AKAV)	27
14. 5 VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA (VEHE).....	28
15.VIRUS DE LENGUA AZUL	29
16.CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	30
17.CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	31
18.PROTEÍNAS ESTRUCTURALES.....	31
18.1 VP2	31
18.2 VP5	32
18.3 LAS PROTEÍNAS DEL CORE MAYOR: VP3 y VP7	32
18. 4 LA PROTEÍNAS DEL COMPLEJO TRANSCRIPSIONAL: VP1, VP4 y VP6.....	32
19.PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES.....	33
19.1 NS1	33
19.2 NS2.....	33
19.3 NS3 y NS3a	34
20.REPLICACIÓN DEL VLA	34
21.RANGO DE HOSPEDEROS.....	35
22TRANSMISIÓN	35
23.DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	37
24.SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES EN EL GANADO OVINO	39
25.SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES EN EL GANADO BOVINO	40
26.PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	41
26.1 INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR (prueba prescrita para el comercio internacional).....	41
26.2 ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)	41
26.3 AISLAMIENTO VIRAL.....	42
26.4 RT-PCR	42

27. IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD DE LENGUA AZUL	42
III. MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1. TIEMPO DE ESTUDIO	44
3.2. ÁREA DE ESTUDIO	44
3.3 PRIMERA ETAPA	45
3.1.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO DE OVINO	46
3.4 SEGUNDA ETAPA	46
3.4.1. CAPTURA Y TRANSPORTE DE <i>Culicoides</i> ADULTOS	46
3.4.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE <i>Culicoides</i> ADULTOS	46
3.4.3. MONTAJE DE <i>Culicoides</i> spp.	47
3.4.4. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS	47
3.5 TERCERA ETAPA	47
3.5.1 CAPTURA E IDENTIFICACIÓN DE <i>Culicoides</i> ADULTOS	47
3.5.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE DE OVINO CON ANTICOAGULANTE PARA LA DETECCIÓN DEL ARN VIRAL DE VLA	48
3.5.3 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL A PARTIR DE <i>Culicoides</i> spp Y SANGRE DE OVINO	47
3.5.4 SÍNTESIS DE ADNc	49
3.5.5 PCR Y PCR ANIDADO	49
3.6. ANÁLISIS DE INFORMACIÓN	50
IV. RESULTADOS	51
4.1 ANÁLISIS SEROLÓGICO	51
4.2 IDENTIFICACIÓN DE <i>Culicoides</i> spp.	52
4.3 DETECCIÓN DEL ARN DEL VIRUS DE LENGUA AZUL	54
V. DISCUSIÓN	56
VI. CONCLUSIONES	62
VII. BIBLIOGRAFÍA	63
VIII. ANEXOS	80

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue identificar *Culicoides* spp. como vectores del virus de Lengua Azul (VLA) en granjas de ovinos de la ciudad de Pucallpa, provincia Coronel Portillo, Ucayali. Las granjas se caracterizaron por la presencia de arbustos, árboles, humedales y charcos; así como por la crianza semiextensiva de ovinos de pelo. El estudio fue realizado en tres etapas: la primera consistió en el análisis serológico de 46 muestras de suero de ovinos procedente de tres granjas mediante la prueba de inmunodifusión en gel agar (IDGA) y ELISA de competición (ELISAc) a fin de seleccionar granjas seropositivas a VLA. En la segunda se capturó 7930 *Culicoides* spp. durante tres días consecutivos con cinco trampas tipo CDC de luz ultravioleta instaladas a 50m aprox de los rebaños desde las 18:00 horas hasta las 06:00 horas del día siguiente; con el fin de determinar la población de especies presentes en las granjas seleccionadas. Por último, se realizó un periodo de captura adicional, obteniéndose 11 pools de 100 hembras cada uno (*Culicoides insignis* : n = 1000 y *Culicoides* spp.: n = 100) y se obtuvo 15 muestras de sangre de ovino para el análisis molecular por PCR anidado utilizando dos pares de cebadores específicos que amplifican el segmento 7 que codifica la VP7 de VLA. Las tres granjas fueron seropositivas a Orbivirus con frecuencias de 46.7, 81.3, 20%, de las cuales el 96% fueron positivas a VLA. Se identificaron 7930 ejemplares de *Culicoides* spp., de los cuales 7839 (98.9%) fueron hembras y 91 (1.1%) machos. La principal especie fue *Culicoides insignis* (94.8%) seguido por *C. foxi* (3.2%) y *C. ocumarensis* (1.3%); otras especies como *C. pseudodiabolicus*, *C. hylas* y *C. leopoldoi* fueron capturados en densidades menores de 0.5%. También se registró a *Culicoides lutzi* aún no reportado en el Perú. De los 11 pool de *Culicoides* spp. (*C. insignis* = 10, *Culicoides* spp.=1), solo en un pool de *C. insignis* se observó banda a nivel de 1070pb, asimismo una muestra de ovino fue positivo. Se concluye que *Culicoides insignis* fue la principal especie capturada, y se ha demostrado la presencia del ARN del VLA en *Culicoides insignis* y en ovinos seropositivos de las granjas en estudio.

Palabras clave: *Ceratopogonidae*, *Culicoides* spp., virus de Lengua Azul, ovino, trópico.

ABSTRACT

The aim of this study was identify *Culicoides* spp. biting midges as Bluetongue virus (BTV) vectors in farms at Pucallpa city, Coronel Portillo province, Ucayali. Farms were characterized by having shrubbery, wetlands and puddles; as well as by extensive breeding of hair sheep. The study was carried out in three stages: the first consisted in the serological analysis of 46 samples of sheep serum from three farms by agar gel immunodiffusion test (AGID) and competition ELISA (ELISAc) in order to select BTV seropositive farms. In the second, 7930 *Culicoides* spp. was captured for three consecutive days with five ultraviolet light CDC traps installed at approximately 50m of the herds from 18:00 hrs. to 6:00 hrs. following day; in order to determine the population of species present in the selected farms. Finally, an additional capture period was obtained, obtaining 11 pools of 100 females each (*Culicoides insignis*: n = 1000 and *Culicoides* spp. : n = 100) and 15 sheep blood samples were obtained for the molecular analysis by PCR nested using two pairs of specific primers that amplify segment 7 that encodes the VP7 of BTV. The three farms were seropositive to Orbivirus with frequencies of 46.7, 81.3, 20%, of which 96% were positive for BTV. Seven thousand ninety three hundred 7930 specimens of *Culicoides* spp. were identified, of which 7839 (98.9%) were females and 91 (1.1%) males. The main species was *C. insignis* (94.8%) followed by *C. foxi* (3.2), *C. ocumarensis* (1.3%) and other species such as: *C. pseudodiabolicus*, *C. hylas* and *C. leopoldoi* were captured in densities lower than 0.5%. Also recorded to *Culicoides lutzi* not yet reported in Peru. From 11 *Culicoides* spp. pools (*C. insignis* = 10, *Culicoides* spp. =1). Only in a pool of *C. insignis*, a 1070 bp band was observed, and a sample of sheep was positive. It is concluded that *Culicoides insignis* was the main species captured, and the presence of the RNA of the BTV in *Culicoides insignis* and a seropositive sheep of the farms under study has been demonstrated.

Key words: *Ceratopogonidae*, *Culicoides* spp., Bluetongue virus, ovine, tropic.

LISTA DE FIGURAS

	Descripción	Pág.
Figura 1.	Morfología de la pupa de <i>Culicoides</i>	7
Figura 2.	Morfología de <i>Culicoides</i> (hembra)	8
Figura 3.	Ciclo de desarrollo y gonotrofico de <i>Culicoides</i> spp.	9
Figura 4.	Ciclo gonotrofico de <i>Culicoides</i> spp. donde: A) nulipara, B) hembra alimentada de sangre, C) hembra gravida, D) hembra parida	10
Figura 5.	Aparato bucal de <i>Culicoides</i> hembra y macho	11
Figura 6.	Diferentes hábitats presentes en una granja donde según las características de los <i>Culicoides</i> pueden desarrollarse.	13
Figura 7.	Morfología de la cabeza de <i>Culicoides</i> ; Izquierda: Cabeza de hembra con antenas pilosas; Derecha: Cabeza de macho con antenas plumosas	15
Figura 8.	Morfología de la parte terminal de <i>Culicoides</i> hembra.	16
Figura 9.	Genitalias donde: A) Extremo posterior de <i>Culicoides</i> hembra; B) Extremo posterior de <i>Culicoides</i> hembra; C) Extremo posterior de <i>Culicoides</i> macho	17
Figura 10.	Distribución de nervios del ala membranosa de <i>Culicoides</i> spp.	18
Figura 11.	Celdas presentes en el ala de <i>Culicoides</i> spp.	18
Figura 12.	Microtriquias las cuales generan las maculas blancas y oscuras que permiten la diferenciación de especies de <i>Culicoides</i> spp.	19
Figura 13.	Distribución geográfica de: IZQUIERDA: <i>Culicoides sonorensis</i> ; DERECHA <i>Culicoides insignis</i>	20
Figura 14.	Ala de <i>Culicoides insignis</i>	20
Figura 15.	Alas de <i>Culicoides</i> del grupo paraensis: 1) <i>C. diversus</i> . 2) <i>C. filiductus</i> . 3) <i>C. neoparaensis</i> . 4) <i>C. paraensis</i> . 5) <i>C. peruvianus</i> . 6) <i>C. quasiparaensis</i>	21
Figura 16.	Distribución de los mosquitos <i>Culicoides</i> del grupo paraensis	22
Figura 17.	Ala de <i>Culicoides foxi</i>	22
Figura 18.	Trampa Onderstepoort	24
Figura 19.	Trampa succionadora tipo mini CDC	25
Figura 20.	Distribución de los principales arbovirus transmitidos por <i>Culicoides</i> spp.	28

	Descripción	Pág.
Figura 21.	Proteínas del cápside interne, intermedia y externa del virus de Lengua Azul	31
Figura 22.	Ciclo de replicación del virus de Lengua Azul	34
Figura 23.	Ciclo de transmisión del VLA por mosquitos del género <i>Culicoides</i>	37
Figura 24.	Distribución mundial del virus de Lengua azul y sus vectores a nivel mundial	38
Figura 25.	Edema mandibular en ovino	39
Figura 26.	A) Severa salivación, dificultad respiratoria y letargo; B) Lengua cianótica	39
Figura 27.	A) Epifora y conjuntivitis; B) Ulceración de pezones	40
Figura 28.	Fotografías de las alas de las especies de <i>Culicoides</i> identificadas en granjas de ovinos de de Pucallpa, Ucayali (Noviembre, 2016)	53
Figura 29.	Genitalia masculina de <i>Culicoides ocumarensis</i>	54
Figura 30.	Ala y proporción palpal de <i>Culicoides lutzi</i> identificado en granjas de ovinos de Pucallpa, Ucayali (Noviembre, 2016)	54
Figura 31.	Electroforesis de productos de PCR anidado con cebadores que amplifican el seg 7 de VLA en muestras de <i>Culicoides</i> spp. Donde: L: Marcador 2000 - 50 bp; 1 a 10: Pools de <i>Culicoides insignis</i> ; 11: Pool de <i>Culicoides</i> spp.; 12: Control negativo; 13: Control Positivo de VLA	55
Figura 32.	Electroforesis de productos de PCR anidado con cebadores que amplifican el seg 7 de VLA en muestras de ovino. Donde L: Marcador 2000 - 50 bp; 1 a 7: Muestras de ovino; 8: Control negativo; 9: Control Positivo de VLA	55

LISTA DE CUADROS

	Descripción	Pág.
Cuadro 1.	Población de Ovino por razas , según región natural	5
Cuadro 2.	Principales razas que se crían en el País	5
Cuadro 3.	Preferencia de hospederos de <i>Culicoides</i> Neotropicales	12
Cuadro 4.	Relación de <i>Culicoides</i> spp. registrados en el Perú	23
Cuadro 5.	Lista de agentes virales y parasitarios transmitidos por mosquitos <i>Culicoides</i> spp.	26
Cuadro 6.	Serotipos de VEHE reconocidos mundialmente	29
Cuadro 7.	Relación de agentes virales del género <i>Orbivirus</i> según la ICTV, 2017	30
Cuadro 8.	Segmentos del ARNdc de VLA y función de sus proteínas estructurales y no estructurales	33
Cuadro 9.	Relación de las 30 especies de <i>Culicoides</i> , que juegan un rol en la transmisión del virus de Lengua Azul a nivel mundial.	36
Cuadro 10.	Localización de vectores <i>Culicoides</i> del virus de lengua azul, sombreado el principal vector en América del Sur	38
Cuadro 11.	Total de pools o muestras para la extracción de ARN, por especie	48
Cuadro 12.	Master Mix GoScript™ Reverse Transcription System	49
Cuadro 13.	Secuencia de cebadores utilizados para el RT-PCR en tiempo real para la detección del segmento 7 de VLA	50
Cuadro 14.	Frecuencia de ovinos de pelo (n=46) seropositivos mediante IDGA, por granja	51
Cuadro 15.	Frecuencia de ovinos de pelo (n=23) seropositivos mediante ELISAc, por granja	52
Cuadro 16.	Especies de <i>Culicoides</i> spp, capturado de granjas de ovinos de Pucallpa Ucayali, 2016	52

LISTA DE ANEXOS

Descripción		Pág.
ANEXO 1.	PROTOCOLO DE INMUNODIFUSIÓN EN GEL AGAR (IDGA), según el KIT COMERCIAL DE VMRD	80
ANEXO 2.	PROTOCOLO DE Celisa	81
ANEXO 3.	PROTOCOLO DE MONTAJE DE CERATOPOGONIDOS	82
ANEXO 4.	MORFOMETRIA DE Culicoides spp.	83
ANEXO 5.	PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	84
ANEXO 6.	PROTOCOLO PARA EL PCR DEL SEGMENTO 7 DEL VIRUS DE AZUL VLA	85
ANEXO 7.	PROTOCOLO PARA EL PCR ANIDADO DEL SEGMENTO 7 DEL VIRUS DE AZUL VLA	86

I. INTRODUCCION

Actualmente, el cambio climático y el calentamiento global están generando cambios en la distribución y abundancia de mosquitos vectores y los arbovirus que ellos transmiten (Hunter, 2003). La propagación de insectos, como algunas especies de mosquitos, ha incrementado la presencia y diseminación de agentes virales hacia países donde no existían reportes de infección, ocasionando la ocurrencia de enfermedades emergentes y/o reemergentes para la salud animal y la salud pública (Purse *et al.*, 2005). Entre la amplia gama de insectos vectores, se cree que los mosquitos *Culicoides* son particularmente más sensibles a cambios (Purse *et al.*, 2008) ya que son poiquiloterms y utilizan una gran variedad de hábitats con áreas semiacuáticas para su desarrollo, por tanto las tasas demográficas y las interacciones con los hospederos son sensibles a variaciones sutiles de temperatura y humedad (Purse *et al.*, 2015).

El género *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: *Ceratopogonidae*) está compuesto por aproximadamente 1400 especies y comprende 31 subgéneros y 38 grupos sin clasificación (Harrup *et al.*, 2015). Los *Culicoides* son pequeños dípteros que miden entre 1 a 5 mm de longitud, y pueden encontrarse en regiones agrícolas intensivas o extensivas, en bosques y en áreas periurbanas (Purse *et al.*, 2015), desde el nivel del mar hasta los 4200 msnm (Spinelli y Borkent, 2004). Los *Culicoides* adultos se alimentan de néctar, azúcar y polen; pero solo las hembras son hematófagas, las cuales requieren ingerir sangre para la maduración de sus ovarios

y el desarrollo de sus huevos (Mellor *et al.*, 2000). Aproximadamente el 96% de las especies se alimentan de sangre de vertebrados, principalmente mamíferos e incluso del ser humano, desempeñando un importante rol en la transmisión de patógenos virales como el Virus de Lengua Azul (VLA) (Meiswinkel *et al.*, 2004).

A nivel mundial, solo 30 especies de *Culicoides* han sido asociadas a la transmisión del VLA, siendo *Culicoides sonorensis* el principal vector en América del Norte; (Smith y Stallknecht, 1996; Tabachnick, 1996). En contraste, en América del Sur existe muy poca información sobre los vectores implicados en la transmisión de VLA, siendo *Culicoides insignis* el posible vector predominante (Gorch *et al.*, 2001), seguido de *C. pusillus*, el cual también está presente en el continente Sudamericano (Ronderos *et al.*, 2003); además se señala como posibles vectores a *C. debilipalpis*, *C. paraensis*, *C. furens* y *C. filarifer* (Aradaib *et al.*, 2009). En el Perú se han descrito 31 especies de *Culicoides*, entre ellas *Culicoides insignis* en Loreto y *C. pusillus* en Cajamarca y Madre de Dios (FelippeBauer *et al.*, 2008); sin embargo, aún no se ha evaluado su implicancia como vectores en la transmisión de VLA.

El VLA es causante de la enfermedad de lengua azul (ELA) caracterizada por afectar al sistema vascular, generando edemas en la cabeza y coronitis en las patas, problemas reproductivos y además restringe el comercio internacional por estar en la lista de enfermedades notificables por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) (Tabachnick, 1996; Wilson y Mellor, 2009). La ELA es endémica en zonas tropicales y subtropicales donde el virus persiste entre algunas especies de *Culicoides* spp. y vertebrados domésticos y silvestres, los cuales se infectan pero no desarrollan la enfermedad. En éstas últimas dos décadas el VLA ha ocasionado severos brotes en rumiantes domésticos y silvestres de países europeos, ubicados fuera del rango latitudinal de 40°N y 35°S, como sucedió en España, Bélgica, Alemania y Suecia debido a la migración de *Culicoides* a altitudes cada vez mayores donde los rumiantes domésticos son susceptibles (Purse *et al.*, 2005; Meroc *et al.*, 2009). Durante los brotes de ELA causado por un solo serotipo del VLA en países europeos más de 800,000 cabezas de ovinos fueron afectados, en Bélgica brotes ocurridos en el 2006 - 2007 ocasionó pérdidas por 180 millones de Euros al año (Tabachnick, 1996; Tatem *et al.*, 2003; Wilson, 2009)

En el Perú, la presencia VLA solo ha sido demostrada serológicamente en ovinos, camélidos y en animales silvestres de áreas tropicales (Rosadio *et al.*, 1984; Rivera *et al.*, 1987; Rivera *et al.*, 2013). En la región selva Felipe-Bauer *et al.* (2008) registraron la presencia de *Culicoides insignis* y *Culicoides pusillus*, potenciales vectores involucrados en la transmisión de VLA. Aproximadamente el 57% del territorio peruano está cubierto de bosques

(Ministerio del Ambiente, 2016) y valles interandinos con climas favorables para la existencia de mosquitos vectores cuya migración a otras altitudes puede ser favorecida por el cambio climático y calentamiento global, pudiendo llegar a la sierra central y sierra sur del país donde se concentra la mayor población de ovinos. El presente estudio tuvo como objetivo general identificar las especies de *Culicoides* spp. como vectores del VLA en un contexto de vigilancia entomológica y epidemiológica del VLA.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN OVINA EN EL PERÚ

La presencia de la crianza de ovinos a lo largo del territorio nacional es de vital importancia en la economía de la población rural, con mayor énfasis en la zona altoandina del Perú entre los 3000-4200 msnm. El sistema de crianza es de tipo semi-intensiva en Costa y en Selva, siendo las ovejas de pelo las que contribuyen en varios sistemas de producción en los trópicos (Atto, 2007). La problemática de la crianza de ovinos en el país radica, principalmente, en baja producción y productividad, bajos índices reproductivos, escasa disponibilidad de material genético de calidad, deficiente manejo animal y sanitario, escasa disponibilidad de paquetes tecnológicos al nivel de pequeños productores, inadecuado uso de residuos de cosecha y subproductos agroindustriales, falta de suplementación mineral y alimenticio en épocas de estiaje, falta de tecnologías sobre obtención, conservación y transformación de productos y subproductos (INIA, 2012)

Sin embargo, el ovino ha logrado mantener su presencia porque se integra con otros tipos de crianzas, no siendo competitivo manteniéndose dentro de su sistema económico del poblador andino en una economía familiar (INIA, 2012). Asimismo el ovino se complementa con la agricultura aprovechando muy bien los residuos de cosecha como fuente de energía, proteína y fibra. En el aspecto económico-social, los ovinos en el Perú con certeza son la caja de ahorro del poblador rural andino dentro de su economía familiar, siendo parte de sus costumbres ahorrar en especie animal y el ovino tiene la preferencia por su rápida comercialización (Díaz, 2007).

Según el IV Censo Nacional Agropecuario (2012) el Perú cuenta con una población de 9 523 198 ovinos, los cuales se distribuyen a nivel nacional, el 5.07 % se registra en la Costa, el 94.21% en la Sierra y el 0.72 % en la Selva (Cuadro 1). Esta población de ovinos ha estado en descenso según el censo realizado en 1994, mostrando una baja de 21,2%. El departamento de Puno es el primer productor de ovinos con el 21.93% de la población nacional, siendo Cusco segundo productor de ovinos con el 13.14 %, seguidos de Junín (8,18%), Huanuco (7,41%), Ancash (7,14%), Huancavelica (6,72%), Ayacucho (6,48%), Pasco (5,82%) entre otros.

Cuadro 1. Población de ovino por razas, según región natural del país (miles de ovinos) (INEI, 2012)

	Corriedale	Hampshire Down	Black Belly	Criollo	Otras	Total
Costa	6,8	10,3	26,9	385,2	51,0	482,5
Sierra	1 071,8	238,4	49,3	7 229,3	329,3	8 972,2
Selva	0,7	1,3	6,3	48,8	10,6	68,5
Total	1 079,5	250,0	82,5	7663,3	391,0	9 523,2

De las razas que se detallan, la que concentra la mayor población es la de Criollos y representa el 81,0%, le sigue en orden de importancia la raza Corriedale con el 11,4%, Hampshire Down 2,6%, Black Belly 0,9% y otras razas 4,1% respectivamente; estos son fuente de carne, leche, estiércol; etc. (Cuadro 2) (INEI, 2012).

Cuadro 2. Principales razas que se crían en el País (INIA, 2012)

Propósito	Raza
Ovinos productores de lana	Merino Australiano Ramboullt Americano Merino Argentino
Ovinos productores de carne	Hampshire Down Suffolk Polled Dorsets Merino precoz alemán Black Belly Pelibuey Criollos
Ovinos de doble propósito	Corriedale Romney Marsh Junín
Ovinos productores de leche	Assaf

2. GENERALIDADES DEL GÉNERO *Culicoides* spp.

El género *Culicoides* Latreille, 1809 está compuesto por aproximadamente 1400 especies y comprende 31 subgéneros y 38 grupos sin clasificación (Harrup *et al.*, 2015). Los *Culicoides* son pequeños dípteros que miden entre 1 a 3 mm de longitud, y pueden encontrarse en regiones agrícolas intensivas o extensivas, en bosques y en áreas periurbanas (Purse *et al.*, 2015), desde el nivel del mar hasta los 4200 msnm (Spinelli y Borkent, 2004). Los *Culicoides* adultos se alimentan de néctar, azúcar y polen; pero solo las hembras son hematófagas, las cuales necesitan ingerir sangre para la maduración de sus ovarios y el desarrollo de sus huevos (Mellor *et al.*, 2000).

3. TAXONOMÍA

DOMINIO: *Eukaryota*

REINO: *Animalia*

Subreino: *Eumetazoa*

FILO: *Arthropoda*

Subfilo: *Hexapoda*

CLASE: *Insecta*

Subclase: *Pterygota*

Intraclase: *Neoptera*

Superorden: *Endopterygota*

ORDEN: *Diptera*

Suborden: *Nematocera*

Infraorden: *Culimorpha*

Superfamilia: *Chironomoidea*

FAMILIA: *Ceratopogonidae*

Subfamilia: *Ceratopogonidae*

Tribu: *Culicoidini*

GÉNERO: *Culicoides* (Latreille, 1809)

Grupos de especies: Es un agrupamiento de especies relacionadas filogenéticamente cercanas. La identificación de las hembras adultas es posible utilizando los patrones alares. (Harrup *et al.*, 2015).

Complejo de especie: Es una agrupación de especies cercanas relacionadas filogenéticamente, pero que no se conocen caracteres morfológicos para diferenciarlos (Harrup *et al.*, 2015).

4. MORFOLOGÍA

4.1 Huevo

Los huevos son alargados de color marrón y tienen una longitud de 250 a 500 μm , éstos son puestos en racimos en sustratos húmedos entre 30 a 200. El número ovipositado por hembra y el tiempo de eclosión, el cual puede ser en 2 a 10 días, varía según la especie y las condiciones extrínsecas como la cantidad ingerida de sangre y las variables bioclimáticas existentes (Zimmer *et al.*, 2014)

4.2 Larva

Las larvas son alargadas y delgadas, lo cual les confiere un aspecto vermiforme y cilíndrico, y constan de 13 segmentos con un tamaño aproximadamente de 0,5 mm de longitud en L1 y alcanzando la L4, posee una longitud de hasta 1 cm en las especies más grandes, aunque este rango suele oscilar en la mayoría entre 2 y 5 mm. El cuerpo es blanco translúcido, la cápsula cefálica amarilla y marrón, y el tórax tiene marcas con un patrón característico de pigmentación subcutánea, siendo los segmentos abdominales y torácicos de tamaño parecido, lo cual confiere una apariencia fusiforme y tubular que favorece el desplazamiento por el medio con un movimiento serpentino particular. Las larvas *Culicoides* poseen setas inconspicuas, excepto las cuatro pares de setas en la parte terminal caudal, y carecen de apéndices torácicos y abdominales (Borkent y Spinelli, 2007)

4.3 Pupa

La pupa (Fig. 1) es de color marrón y tiene un par de protuberancias protorácicas respiratorias con múltiples aperturas espiraculares en la punta. Los tubos respiratorios repelen el agua, lo que permite la obtención de oxígeno atmosférico durante la metamorfosis a la etapa adulta. Estos tubos unidos a una cámara de aire situado bajo los parches alares, también llamados pterotecas, provee flotación para mantener la pupa en superficie. Las espinas, setas, protuberancias y procesos de las pupas pueden utilizarse como caracteres para la diferenciación taxonómica (Zimmer *et al.*, 2014; Mullens *et al.*, 2015)

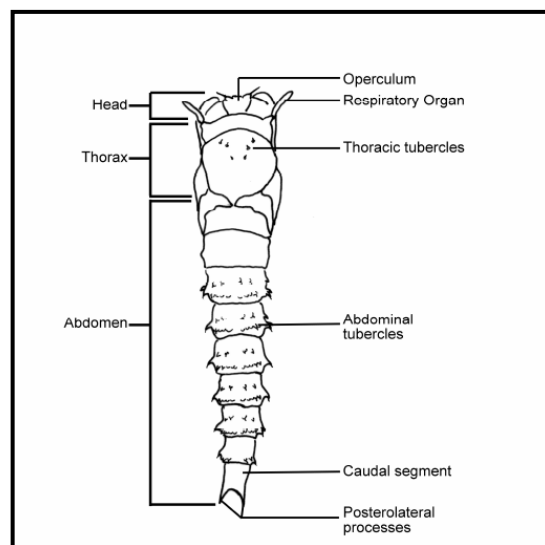


Figura 1. Morfología de la pupa de Culicoides (Swanson, 2012)

4.4 Adulto

Los adultos tienen una longitud de 1 a 5 mm y adquieren su coloración final después de la esclerotización de sus estructuras. La morfología general de los *Culicoides* está compuesta por la cabeza, el tórax dividido en tres segmentos (protórax, mesotórax y metatórax), el abdomen, tres pares de patas que terminan en un gancho/garra, y un par de alas que salen del mesotórax (Mihn Hoan T., 2010) (Fig. 2)

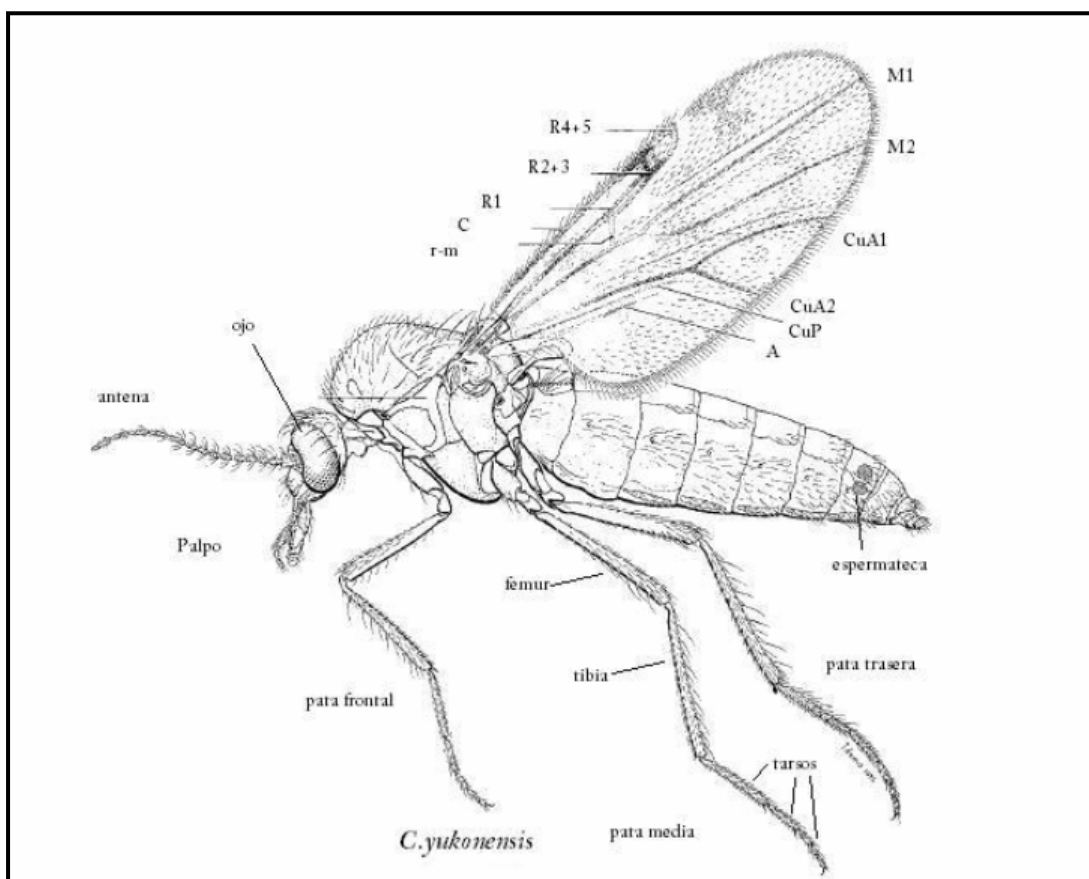


Figura 2. Morfología de *Culicoides* (hembra).

Venas: r-m: radio medial, C: costal, R1: vena radial 1, R2+3: vena fusionada radial 2 y 3, R4+5: vena fusionada radial 4 y 5, M2: vena mediana 1, M2: vena mediana 2, CuA1: vena cubito-anal 1, CuA2: vena cubito-anal 2, CuP: vena cubito-postical, A: vena anal (Borkent y Spinelli, 2007)

Como en todos los dípteros, las alas están ancladas a uno de los tres segmentos que conforman el tórax, concretamente al mesotórax, y cuando el insecto está en reposo se sitúan sobre el abdomen compuesto de diez segmentos aproximadamente iguales, excepto el segmento terminal reducido, donde encontramos las estructuras genitales. Sus alas son membranosas, estrechas, redondeadas en su extremo distal y con una venación exigua característica que distingue a los *Ceratopogonidae* de otros dípteros (Borkent y Spinelli, 2007).

5. CICLO BIOLÓGICO

5.1 Ciclo de desarrollo (Fig. 3):

Presentan un ciclo de vida holometábolo que dura aproximadamente de 2 a 6 semanas en función de la temperatura.

- **Huevos:** Son depositados en un patrón de doble fila sobre un sustrato húmedo. El desarrollo del huevo dura de 2 (a 27°C) a 3-4 días (a 22°C) (Mullens *et al.*, 2015).
- **Larva:** Las larvas pasan por cuatro estadios, la cual dura de 12 a 16 días dependiendo de la temperatura (Narladkar *et al.*, 2006)
- **Pupa:** La mayoría de las especies presentan una fase de pupa que es capaz de flotar si se produce una inundación del sustrato, excepto en el caso de *C. imicola* que no pupan hasta que las condiciones ambientales son lo suficientemente secas (Zimmer *et al.*, 2014)
- **Imago:** Los adultos emergen 2 o 3 días después del estado de pupa y un día más tarde ya ingieren sangre y realizan la cópula que tiene lugar en enjambres. En periodos fríos la vida del insecto se alarga considerablemente, pudiendo llegar a vivir hasta 63 días (Sellers y Mellor, 1993), mientras que su actividad disminuye. Por el contrario, en periodos cálidos, su actividad es mayor y su vida se acorta. El intervalo óptimo de temperatura para la actividad de estos insectos se sitúa entre los 13° y los 35°C (Sellers y Mellor, 1993; Mullens *et al.*, 2015).

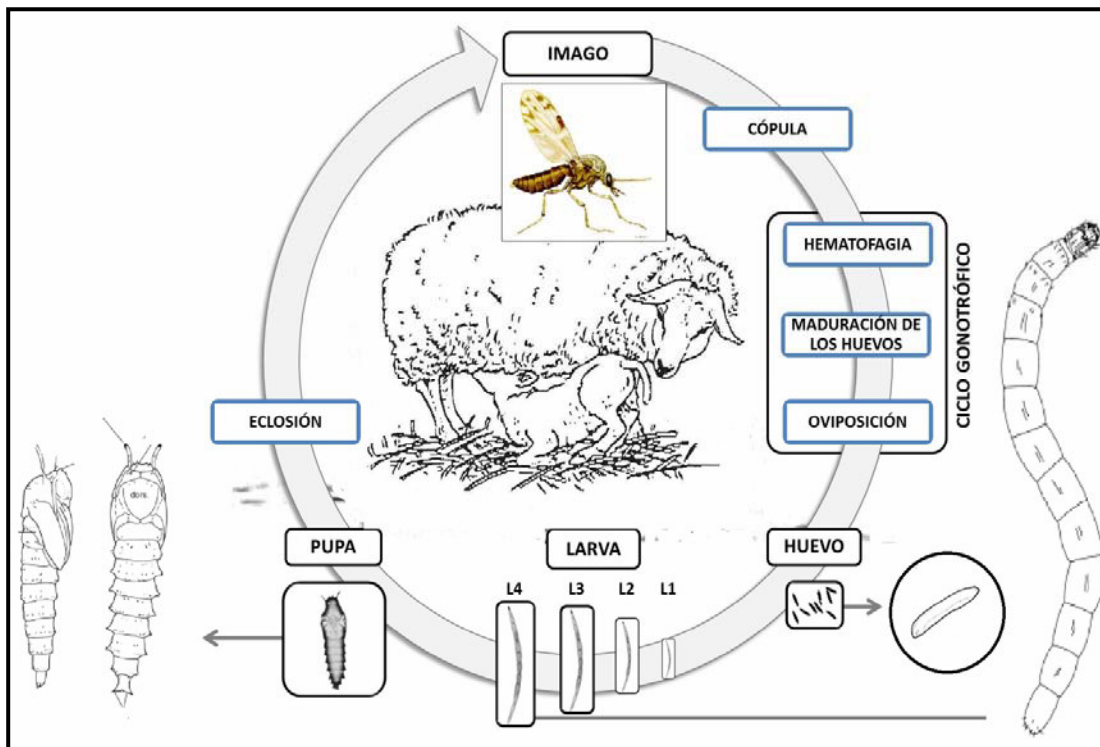


Figura 3. Ciclo de desarrollo y gonotrófico de *Culicoides* spp.

5. 2 Ciclo gonotrófico:

Se denomina ciclo gonotrófico al ciclo desde alimentación y la maduración de los huevos, seguido de la oviposición. Mayoritariamente se acepta que dichos estadios se pueden discriminar por la observación del abdomen (Dyce, 1969), aunque algunos autores han demostrado las limitaciones del método (Braverman y Mumcuoglu, 2009). En las hembras de *Culicoides* se diferencian cuatro estadios gonotróficos (Fig. 4):

- **Hembras Nulíparas:** el abdomen del insecto es blanquecino-transparente indicando que es una hembra que aún no se ha alimentado de sangre (Wall, 2016).
- **Hembras Alimentadas de Sangre:** se observa el abdomen hinchado y rojizo debido a una ingesta de sangre reciente (Wall, 2016).
- **Hembras Grávidas:** dos sacos repletos de huevos listos para la oviposición (Wall, 2016).
- **Hembras Paras:** el insecto ya ha depositado los huevos y se observa un abdomen con pigmentación rojiza debido a los restos de la sangre ingerida anteriormente (Wall, 2016).

En principio, las hembras paras son las únicas capaces de transmitir el virus, ya que han ingerido y digerido sangre potencialmente infectada, habiendo transcurrido el periodo de incubación extrínseco necesario para la replicación y diseminación del virus en el insecto. De hecho, los distintos tipos de Orbivirus se han aislado tan solo de hembras paras (Kramer *et al.*, 1990).

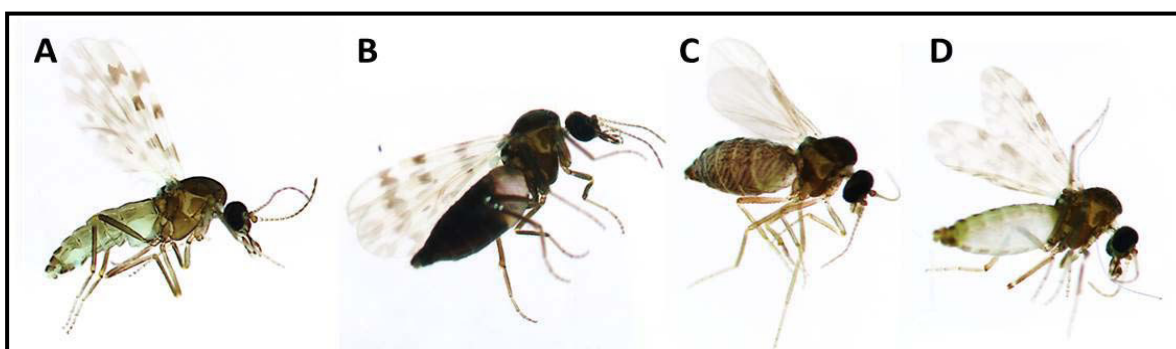


Figura 4. Ciclo gonotrofico de *Culicoides* spp. donde: A) nulipara, B) hembra alimentada de sangre, C) hembra grávida, D) hembra parida (Wall, 2016)

6. HÁBITOS ALIMENTICIOS

Las hembras de algunas especies requieren alimentarse de sangre (hematófagas) para desarrollar sus huevos, sin embargo hay hembras que pueden dejar su primer lote de huevos sin necesidad de la ingesta de sangre (especies autógenas) (Borkent y Spinelli, 2007). Todas

requieren de una fuente de hidratos de carbono, se ha visto que las hembras de *C. mississippiensis* se alimentan de las flores de plantas de Yaupon (*Ilex vomitoria*), *C. paraensis* de plantas de varias Bromeliaceae, cacao, caucho y banana; donde podrían estar cumpliendo un papel importante como polinizadores (Borkent y Spinelli, 2007).

Las hembras perforan la piel con sus mandíbulas y maxilas finamente dentadas, y se forma un cúmulo de sangre de la cual se alimentan, lo cual es denominado como telmofagia (Fig. 5). Los machos de los *Culicoides* son similares a las hembras, pero las estructuras bucales no poseen dientes distales ni son aptas para perforar y alimentarse de sangre como en el caso de las hembras. Se ha visto tanto a machos como a hembras alimentándose de néctar de flores pequeñas, preferentemente de color blanco y verde (Borkent y Spinelli, 2007).

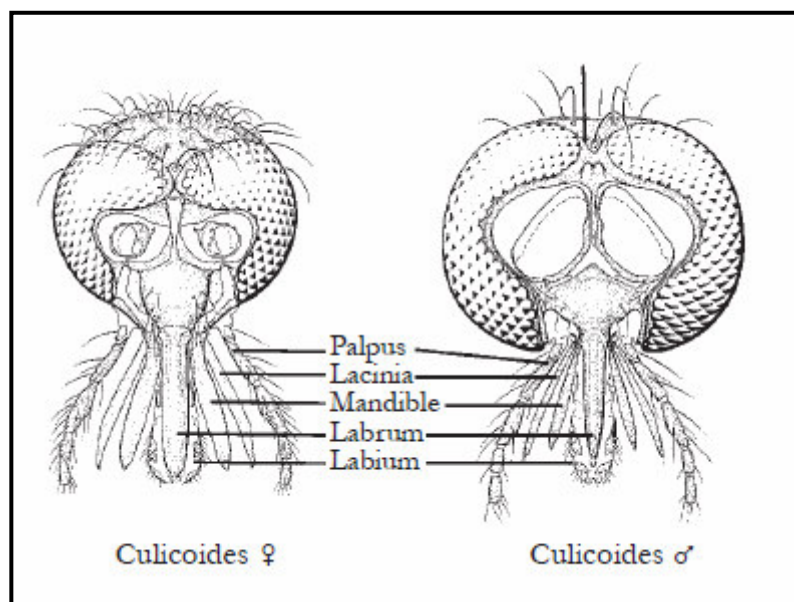


Figura 5. Aparato bucal de *Culicoides* hembra y macho (Borkent y Spinelli, 2007)

7. PREFERENCIAS DE HOSPEDEROS

La mayoría de los *Culicoides* muestran algún grado de preferencia por el hospedero (Cuadro 3). Su sistema olfativo se basa en las antenas y palpos maxilares y es bastante sensible, que en combinación con otros sentidos sirven para localizar los huéspedes con altísima precisión (Braverman *et al.*, 2012). Existe una preferencia de sitios de alimentación: en las vacas debajo del vientre, en las patas y alrededores de la pezuña y cabeza (Elbers y Meiswinkel, 2015), en los seres humanos las partes más propensas son las piernas, pies y zonas descubiertas; siendo las mujeres y niños los más afectados por las picaduras. Se estima que la cantidad de sangre ingerida por picadura es de 4×10^{-2} ml, mediante un proceso de diuresis que concentra

rápida mente la sangre (Mellor, 2000). En la región Neotropical 70 de las 266 especies de *Culicoides* son antropofílicas (Borkent y Spinelli, 2007).

Las siguientes especies se encuentran en un número considerable y representan un problema para las poblaciones humanas: *C. furens* y *C. phlebotomus* en las zonas costeras de Centro América y parte norte de Sudamérica; *C. maruim* en la zona costera de Brasil; *C. insinuatus*, *C. puracensis* y *C. pachymerus* en los Andes y piedemonte Colombianos; *C. pseudodiaboli* y *C. paraensis* en la cuenca Amazónica; *C. lahillei* y *C. debilipalpis* en Paraguay y noreste de Argentina; *C. caridei* en Uruguay y la provincia de Buenos Aires-Argentina; y *C. patagoniensis* en Argentina y la Patagonia Chilena (Borkent y Spinelli, 2007; Ninio *et al.*, 2011)

Cuadro 3. Preferencia de hospederos de *Culicoides* Neotropicales (Borkent y Spinelli, 2007)

Especies de <i>Culicoides</i> spp.	Hospederos			
	Humano	Primate no humano	Bovino	Equino
<i>C. pusillus</i>	-	-	Si	Si
<i>C. foxi</i>	-	-	-	Si
<i>C. carpenteri</i>	-	-	Si	-
<i>C. ocumarensis</i>	-	-	Si	-
<i>C. diabolicus</i>	-	-	Si	Si
<i>C. filarifer</i>	Si	-	-	Si
<i>C. leopoldoi</i>	-	Si	-	-
<i>C. hylas</i>	Si	Si	-	-
<i>C. batesi</i>	-	Si	-	Si
<i>C. guttatus</i>	-	Si	Si	Si
<i>C. fusipalpis</i>	-	Si	-	-
<i>C. insignis</i>	-	-	Si	-
<i>C. pseudodiaboli</i>	Si	-	-	-
<i>C. paraensis</i>	Si	-	-	-
<i>C. debilipalpis</i>	Si	-	-	-
<i>C. lahillai</i>	Si	-	-	-

*Si: principales hospederos considerados fuente de alimento para las especies de *Culicoides*

8. DISTRIBUCIÓN Y HÁBITATS

Las especies de *Culicoides* se pueden encontrar prácticamente en todas las grandes masas de tierra, con las únicas excepciones de la Antártida, Nueva Zelanda, Islandia y las islas Hawái (Purse *et al.*, 2015)

Los *Culicoides* ocupan una amplia gama de hábitats semiacuáticos y están muy asociados a la presencia de granjas donde las personas y animales son su fuente de alimento (Fig. 6). La característica de los hábitats incluyen:

- **Deposiciones frescas de animales:** Por ejemplo, *C. bolitinos*, *C. brevitarsis*, *C. chiopterus*, *C. dewulfi* (Purse *et al.*, 2015).
- **Agua superficial e interfase agua-tierra** (con enriquecimiento orgánico o no): Por ejemplo, *C. insignis*, *C. pulicaris*, *C. stellifer*, *C. sonorensi* (Purse *et al.*, 2015).
- **Cavidades de árboles, plantas, grietas de rocas** y un suelo altamente orgánico con aéreas húmedas: Por ejemplo, *C. imicola*, *C. obsoletus*, *C. pusillus* (Purse *et al.*, 2015).

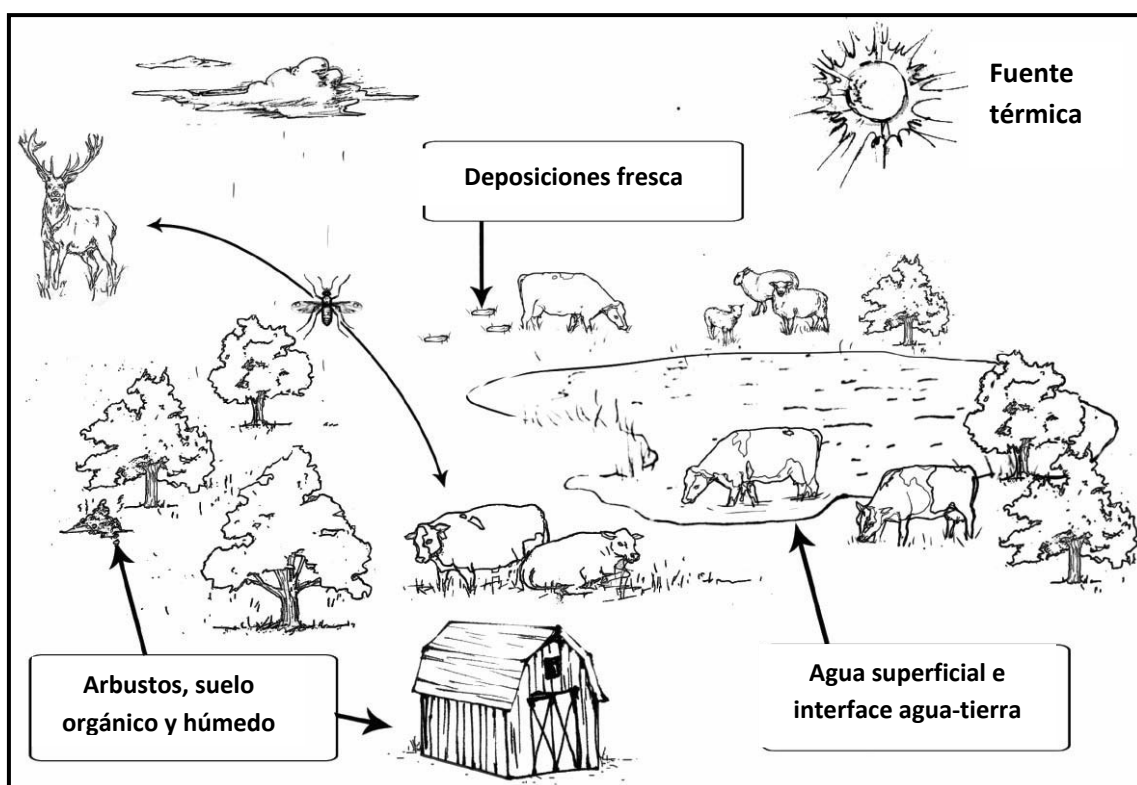


Figura 6. Diferentes hábitats presentes en una granja donde según las características de los *Culicoides* pueden desarrollarse (Purse *et al.*, 2015)

9. DINÁMICA DE *CULICOIDES*

La temperaturas en las que el vuelo tiene lugar se sitúan entre los 12 y los 35 °C, a esas temperaturas pueden encontrarse *Culicoides* volando hasta alturas de 1.7 Km (Blackwell, 2008)

Pueden considerarse dos tipos de vuelo:

9.1 Activo: En ausencia de viento, o cuando este es de baja intensidad, los *Culicoides* pueden volar cortas distancias, tanto a favor como en contra del viento. (Beer *et al.*, 2013).

9.2 Pasivo: Debido a su pequeño tamaño, no se suelen encontrar *Culicoides* volando activamente cuando la velocidad del viento supera los 7 m/s. Cuando la fuerza del viento es mayor, los *Culicoides* pueden ser transportados por las corrientes de aire recorriendo distancias de hasta 700 Km (Elbers *et al.*, 2015), con el consiguiente riesgo de introducción del VLA. Con ayuda del viento los individuos podrían viajar distancias considerables y lo cual explicaría el surgimiento de enfermedades transmitidas por *Culicoides* en zonas no endémicas y su rápida dispersión, como en los brotes del virus de la lengua azul en Europa desde la península ibérica y las islas mediterráneas hacia el interior del continente (Perie *et al.*, 2005) y el reciente brote del virus de Schmallerberg al norte de Europa (Beer *et al.*, 2013).

En cuanto a su ritmo circadiano, la mayoría de las especies poseen en general una actividad crepuscular (son activos durante el crepúsculo, por tanto al amanecer o al anochecer) y nocturna. Cuando empieza a caer la intensidad de la luz su actividad se dispara por lo que normalmente suelen empezar a volar al ponerse el sol, hecho que va ligado a una disminución de la temperatura y aumento de la humedad ambiental (Purse *et al.*, 2015). Recientemente se ha comprobado que llegan a penetrar activamente dentro de las estabulaciones para alimentarse de los animales que se encuentran en su interior, por lo que no solo tienen un comportamiento exófilo sino también endófilo, es decir, la ingesta de sangre, la zona de reposo habitual e incluso el desarrollo de los estadios preimaginales pueden tener lugar en un ambiente cerrado (Lucientes *et al.*, 2008, Zimmer *et al.*, 2010, Ninio *et al.*, 2011). En el Neotrópico, los *Culicoides* están en mayor número en la mañana hasta poco después del amanecer, al ocaso y en las horas tempranas de la noche; dependiendo de la especie también se los encuentra a la media tarde o durante todo el día (Borkent y Spinelli, 2007)

10. IDENTIFICACIÓN DE MOSQUITOS DEL GÉNERO *Culicoides* spp.

Para la identificación de *Culicoides* en el Neotrópico, se ha utilizado taxonomía clásica basada en criterios morfológicos muy característicos de este género y algunas medidas morfométricas (Wirth *et al.*, 1988; Felipe-Bauer *et al.*, 2009; Spinelli *et al.*, 2009)

10.1 Cabeza:

10.1.1. Ojos: Tienen un par de ojos compuestos bastante grandes, reniformes, que inician en la cara anterior de la cabeza, cubren las caras laterales y llegan hasta la frente; donde en algunas

especies se juntan y en otras están parcial o moderadamente separados, esto es de importancia en la identificación. Las omatidias (ojos individuales que forman el ojo de los insectos) están separadas entre sí por espacios que están cubiertos con pelos finos (Spinelli *et al.*, 2005).

10.1.2. Antenas: Poseen un par de antenas moniliformes (segmentos alargados y ensamblados como una cadena). Se originan en la parte superior de la convexidad justo debajo de los ojos. Cada antena se compone de 15 segmentos, rara vez 14 en algunos machos (Spinelli *et al.*, 2005). Los segmentos de las antenas son:

El pre-escapo (segmento I) el cual es un anillo esclerotizado inserto en la cabeza,

El escapo (segmento II) que es un anillo abultado y

Los segmentos restantes III-XV. En los machos los dos primeros segmentos son bastante abultados y ocupan toda la convexidad mientras que en las hembras son poco abultados. En las hembras los segmentos III-X son cilíndricos y cortos mientras que los segmentos XI-XV son generalmente cilíndricos y alargados. En los machos los segmentos III-XII son hinchados en la base y bastante cortos, mientras los segmentos XIII-XV son largos; la antena de los machos tiene penachos pilosos por lo que tienen una apariencia más plumosa que la antena de las hembras (Kline y Axtell, 1999; Minh, 2010). (Fig. 7).

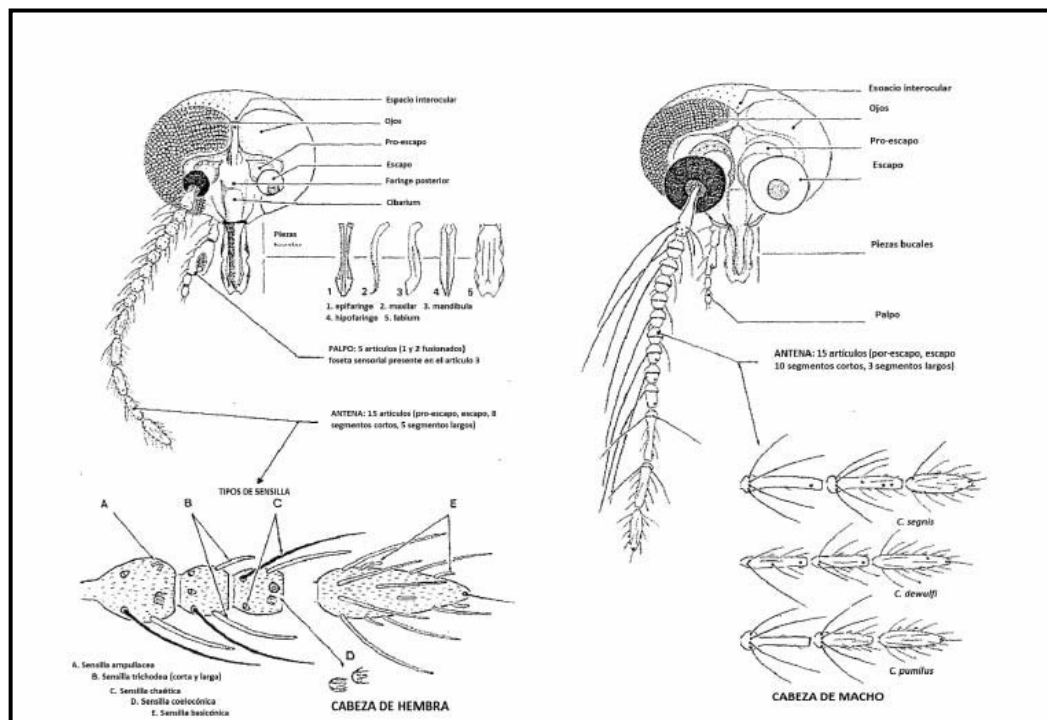


Figura 7. Morfología de la cabeza de *Culicoides*; Izquierda: Cabeza de hembra con antenas pilosas; Derecha: Cabeza de macho con antenas plumosas (Mihn hoan, 2010)

10.2 Patas: Son tres pares de patas alargadas y delgadas, siendo el primer par más corto; cada pata se compone de enganche, trocánter, fémur, tibia y cinco segmentos tarsales. El peine tibial es un conjunto de 4-6 espinos principales y setas secundarias, ubicadas en el extremo inferior de la tibia de las patas medias que junto con el patrón de pigmentación de las bandas en la tibia y fémur de cada pata son de interés taxonómico (Swanson, 2012).

10.3 Abdomen: Está formado por once segmentos, cuyo último segmento forma un cerco (Fig. 8, Fig.9A) en las hembras y el hipopigium en los machos. La parte dorsal del abdomen es generalmente más oscura que la ventral. La morfología externa e interna es de importancia en la identificación de las especies (Swanson, 2012).

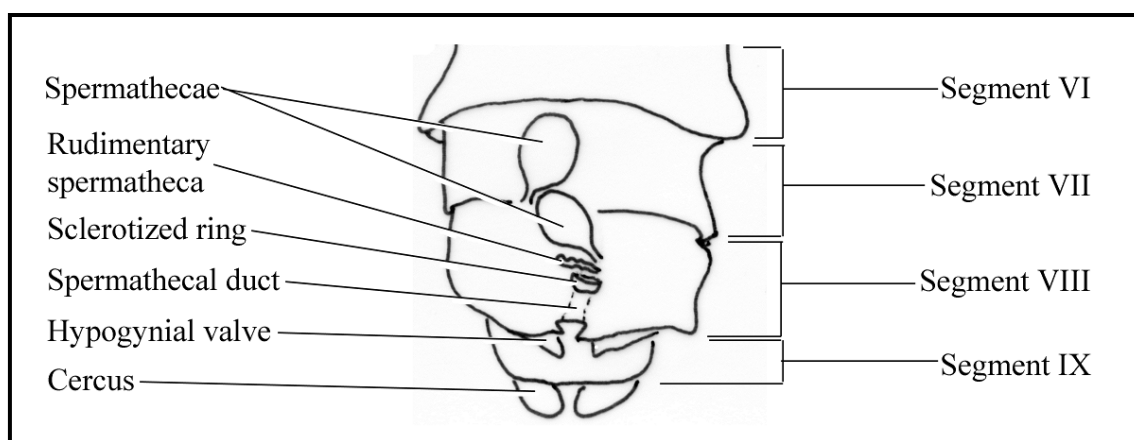


Figura 8. Morfología de la parte terminal de *Culicoides* hembra (Swanson, 2012)

10.4 Espermateca (hembras): son ovarios fusiformes en números de 1 a 4 de los cuales 1 a 3 son funcionales y uno es vestigial (no funcional) (Fig. 9A, Fig. 9B), se conectan a través de oviductos que se fusionan y en la parte final tienen un anillo esclerotizado de formas y dimensiones diferentes que son útiles en la identificación de especies. Son de interés taxonómico el número, forma y tamaño (largo y ancho) de las espermatecas; presencia o ausencia del conducto esclerotizado que conecta a las espermatecas a los oviductos; forma y tamaño (largo y ancho) del anillo esclerotizado y la espermateca vestigial; grosor y magnitud de separación de las placas esclerotizadas en el octavo segmento (Mihn, 2010; Swanson, 2012).

10.5 Hipopigium (machos): es más importante en la identificación de las especies macho (Fig. 9C). Las estructuras que lo componen son: pene o aedeagus, parámero, cercus, esterno, tergo, lamella, estilo, coxito, apodema. El noveno segmento tiene la forma de un anillo irregular esclerotizado compuesto del tergo fusionado al esternón. El noveno tergo tiene la forma de un lóbulo expandido o placa, está flanqueada por un par de lóbulos membranosos llamados cercus en la cara ventromesal. El aedeagus es generalmente una estructura en forma de

“Y” con el vástago dirigido ventro caudalmente, formando el soporte esclerotizado en la superficie ventral del conducto genital masculino; la porción distal es menos esclerotizado que los brazos basales y en forma de “U”. Los parámetros son un par de escleritos internos esclerotizados en forma de barra, en algunos grupos de especies los parámetros pueden estar fusionados y parecer un plato mesal. Para taxonomía se observa la forma, tamaño y coloración del aedeagus, tamaño, grosor del cercus y de los parámetros (Mihn, 2010; Gonzalez y Goldarazena, 2011; Swanson, 2012)

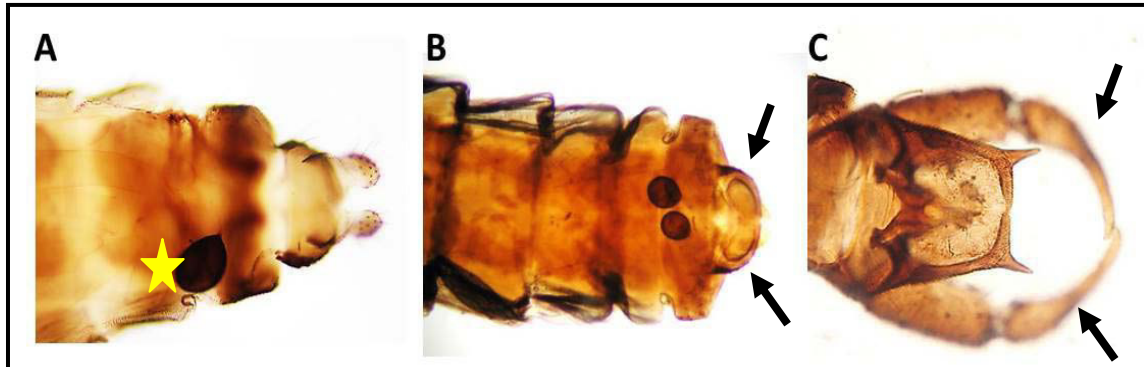


Figura 9. Genitalias donde: A) Extremo posterior de *Culicoides* hembra (*se aprecia la espermateca) B) Extremo posterior de *Culicoides* hembra (las flechas señalan el cercus). C) Extremo posterior de *Culicoides* macho (las flechas señalan el hipopigium) (Alarcon, 2015)

Alas: Son redondeadas en su extremo distal y con una venación exigua característica que distingue a los *Ceratopogonidae* de otros dipteros, siendo los patrones alares en *Culicoides* la base para la identificación morfológica debido a la alta variabilidad interespecífica en la pigmentación (Rawlings 1996, Perruolo, 2009).

11. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Culicoides* spp.

Las alas son las estructuras más importantes en relación a la taxonomía de *Culicoides* ya que éstas permiten la diferenciación de especies de *Culicoides* (Perruolo, 2009). Estas tienen patrones geométricos y de pigmentación específicos que son de utilidad en el diagnóstico y clasificación de especies. Cada ala está constituida por: nervaduras o venas, celdas y elementos anexos. (McAlpine, 1981; Spinelli *et al*, 2005; Borkent y Spinelli, 2007; Minh, 2010).

Tamaño: En relación al tamaño las especies del Neotrópico; pueden medir entre 0.63-2.16 mm de largo (Wirth *et al.*, 1988)

11.1 Las nervaduras: Son un conjunto de conductos huecos que forman un diseño particular por especie. Desde el borde anterior al posterior, se distinguen 7 nervaduras principales (Spinelli, 2005; Borkent y Spinelli, 2007; Perruolo, 2009) (Fig. 10)

- Costal (C)

- Subcostal (ssC),
- Radial (R se divide en ramal anterior R1+2, ramal posterior R3+4+5)
- Media (M se divide en ramal anterior M1, ramal posterior M2)
- Radio-medial (r-m)
- Cubital (Cu se divide en ramal anterior Cu1 y posterior Cu2)
- Anal (ramales An1 y An2).

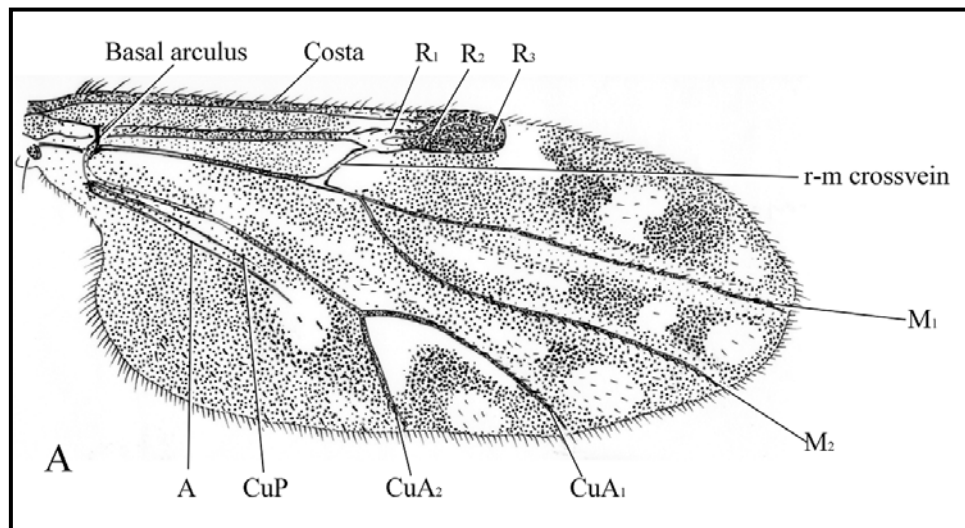


Figura 10. Distribución de nervios del ala membranosa de *Culicoides* spp. (Swanson, 2012)

11.2 Celdas: Son los espacios llanos formados por las venas y los bordes de las alas (Fig. 11); desde lo anterior a posterior se ubican: celda subcostal (ssc), basal (b), radial (r, r1, r2), media (m, m1, m2), cubital (cu) y anal (an) (Borkent y Spinelli, 2007; Perruolo, 2009)

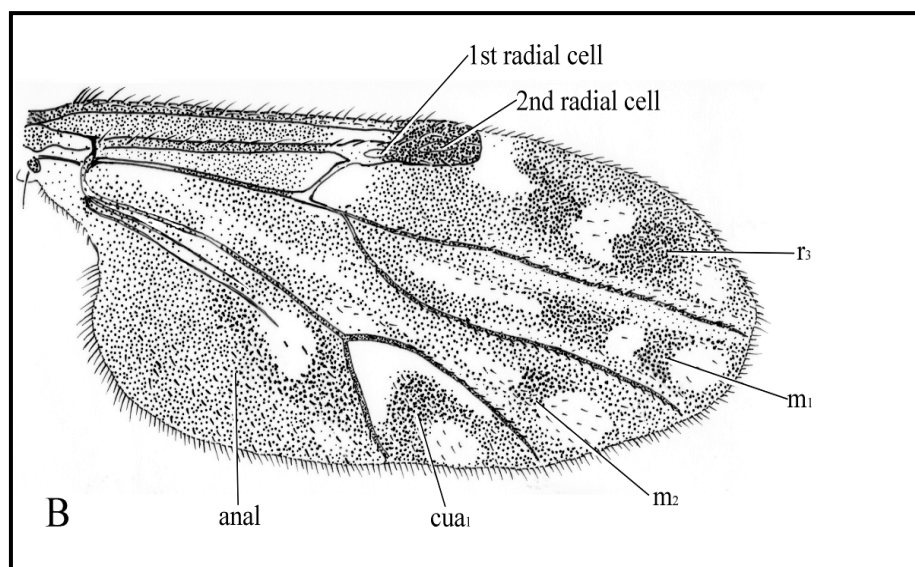


Figura 11. Celdas presentes en el ala de *Culicoides* spp. (Swanson, 2012)

11.3 Los elementos anexos: corresponde a las microtriquias, macrotriquias y las cerdas. Las microtriquias son pequeñas extensiones pilosas de la cutícula y distribuidas por toda el ala. Las macrotriquias con estructuras pilosas más largas que las microtriquias, tienen una base alveolar en la superficie del ala, su distribución difiere según las especies y generalmente cerca del borde de las celdas r3, m1, m2 y venas radiales. Las cerdas son estructuras pilosas que están generalmente al borde del ala en la celda costal y anal (Fig. 12) (Spinelli, 2005; Borkent y Spinelli, 2007; Perruolo, 2009)

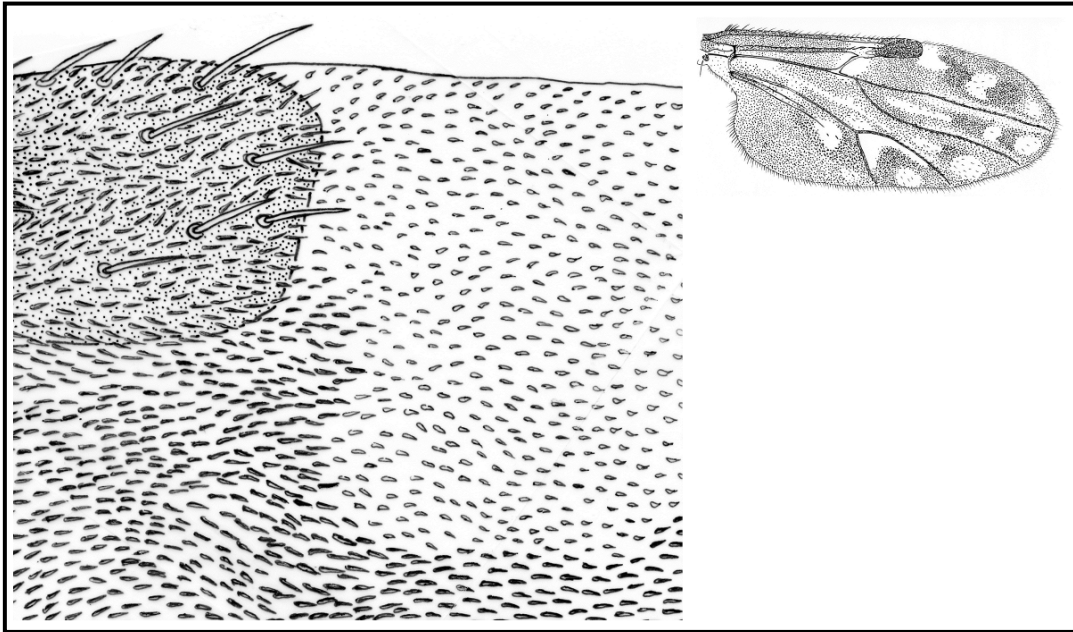


Figura 12. Microtriquias las cuales generan las maculas blancas y oscuras que permiten la diferenciación de especies de *Culicoides* spp. (Swanson, 2012)

12. PRINCIPALES ESPECIES DE *Culicoides* spp. REGISTRADAS EN LA REGIÓN NEOTROPICAL Y PERÚ

Las principales características para diferenciar las especies registradas en la región neotropical es descrita inicialmente en el atlas de alas de *Culicoides* de la región neotropical por Wirth *et al.*, en el 1988.

12.1 *Culicoides insignis* Lutz, 1913. Es la especie perteneciente al subgénero *Hoffmania* más importante por su capacidad vectorial demostrada del virus de lengua azul. Su distribución está restringida a zonas cálidas desde el Caribe hasta Argentina. Se ha registrado en Estados Unidos, México, Central América, y el Caribe; Brasil (Amazonas, Pará, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Maranhão, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo,

Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, y Santa Catarina), Ecuador, Venezuela y Perú (Fig. 13) (Felippe-Bauer *et al.*, 2008; Perruolo, 2009; de Sousa *et al.*, 2016)

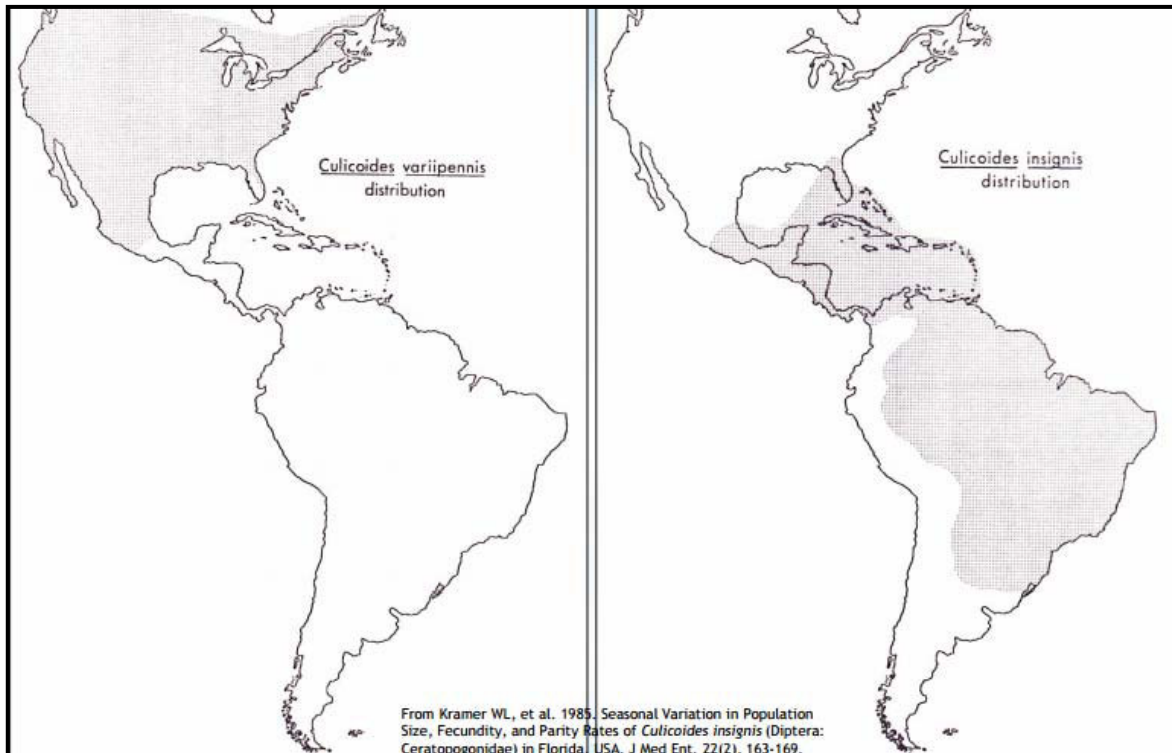


Figura 13. Distribución geográfica de: IZQUIERDA: *Culicoides sonorensis*; DERECHA *Culicoides insignis* (Adaptado de Kramer *et al.*, 1985)

La principal característica de *C. insignis* es un patrón de alas donde la vena R-M está fuertemente pigmentada de modo continuo hasta el área clara en la celda R2 y un área oscura fuertemente pigmentada en la celda R1 (Fig. 14) (Spinelli *et al.*, 1993; Perruolo, 2009).

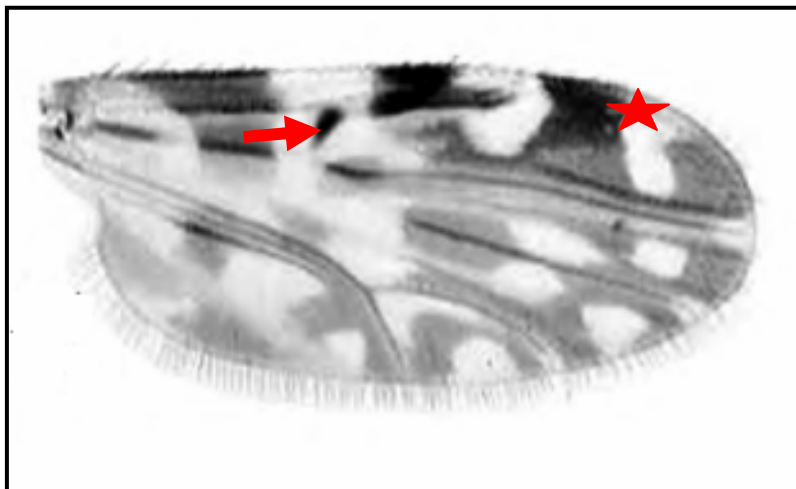


Figura 14. Ala de *Culicoides insignis* (flecha: pigmentación fuerte de la vena r-m; *Área oscura en celda R1) (Perruolo, 2009)

12.2 *Culicoides pusillus* Lutz, 1913

Es la segunda especie de *Culicoides* involucrado en la transmisión del virus de lengua azul en la region neotropical. Este se caracteriza por su pequeño tamaño, su ala carece de maculas palidas distales. Esta especie es una excepción entre las especies relacionadas del subgénero *Culicoides* (*Avaritia*) debido al vértice de la segunda célula radial, la cual es muy corta completamente oscura o muy poco invadida por la mancha pálida postestigmática (Wirth y Blanton 1959). Se distribuye desde Estados Unidos a America Central y del Sur hasta la región noreste de Argentina y Brasil.

12.3 *Culicoides paraensis* Goeldi, 1905

Es la especie de mayor importancia de la familia *Ceratopogonidae* con importancia en salud pública en la región Neotropical. Es el vector del nemátodo *Manzonella ozzardi* en Argentina (Shelley y Coscarón, 2002) y del virus Oropouche (ORO) en Panamá, Perú y Brasil (Tesh, 1994). Esta especie se encuentra en el grupo *paraensis* junto a *C. diversus*, *C. filiductus*, *C. neoparaensis*, *C. peruvianus* y *C. quasiparaensis* (Fig. 15). Su distribución es a lo largo de América del Norte, América Central y Caribe y llega hasta Argentina y Uruguay (Felippe-Bauer *et al.*, 2003) (Fig. 16)

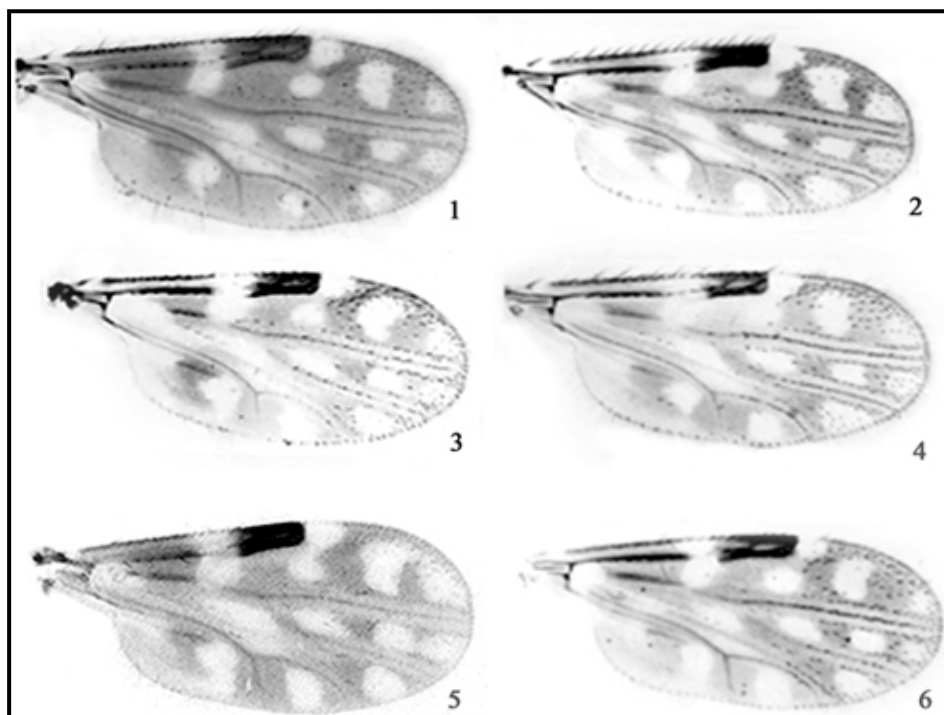


Figura 15. Alas de *Culicoides* del grupo *paraensis*: 1) *C. diversus*. 2) *C. filiductus*. 3) *C. neoparaensis*. 4) *C. paraensis*. 5) *C. peruvianus*. 6) *C. quasiparaensis* (Felippe-Bauer *et al.*, 2013)

El ala de esta especie se caracteriza por presentar tres maculas claras en la celda M1, existe una mancha pálida distal claramente separada de la región apical, además en las hembras hay una tercera espermáteca rudimentaria y más pequeña en comparación a las demás (Felippe-Bauer *et al.*, 2003).

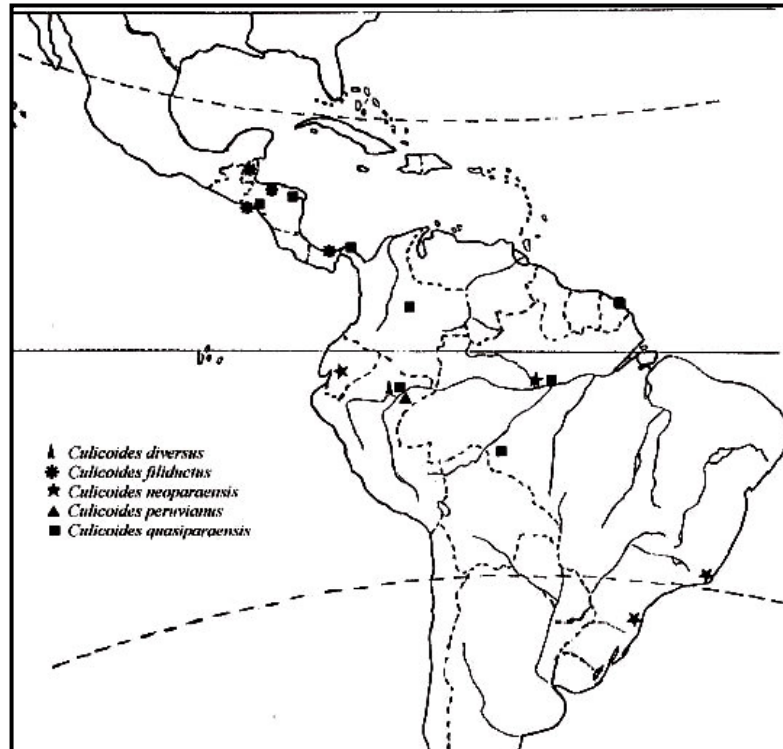


Figura 16. Distribución de los mosquitos *Culicoides* del grupo paraensis (Felippe-Bauer *et al.*, 2013)

12. 4 *Culicoides foxi* Ortíz, 1950

Asociado a la presencia de equinos y mulas, su ala se caracteriza por la presencia de la pigmentación de la vena radial-medial, igual que *C. insignis*, pero a diferencia de *C. insignis* la pigmentación no es continua en la vena R3 (Fig. 17), solo presenta una mancha débilmente negra antes de la curvatura, además la espermateca es subesférica a oval (Spinelli *et al.*, 1993). Esta especie se distribuye desde México a la región noreste de Argentina

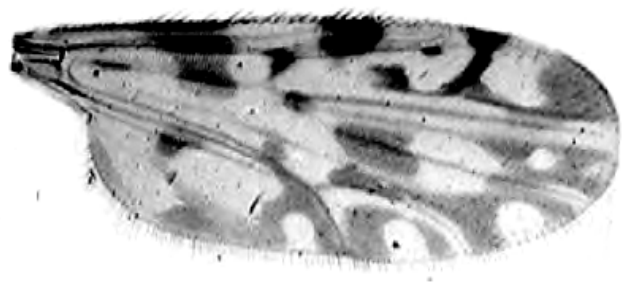


Figura 17. Ala de *C. foxi* (la flecha señala la mancha oscura, característica que la diferencia de *C. insignis*) (Perruolo, 2009)

A continuación se detallan las especies de *Culicoides* registradas en el Perú (Cuadro 4)

Cuadro 4. Relación de *Culicoides* spp. registrados en el Perú (Felippe-Bauer *et al.*, 2008)

Subgéneros	Grupos	Especies	Localización
Anilomyia	Covagarciai	<i>C. efferus</i>	Región amazónica
Avaritia	---	<i>C. pusillus*</i>	Cajamarca, Madre de Dios
Haematomyidium	---	<i>C. debilipalpis</i>	Loreto, Cajamarca, Amazonas y Madre de Dios
		<i>C. insinuatus</i>	Loreto, San Martin.
		<i>C. lahillei</i>	Amazonas
		<i>C. paraensis</i>	Región amazónica
Haematomyidium	Paraensis	<i>C. quasiparaensis</i>	Loreto
		<i>C. diversus</i>	Loreto
		<i>C. peruvianus</i>	Amazonas
		<i>C. foxi</i>	Loreto, Amazonas, Madre de Dios y San Martin
Hoffmania	Guttatus	<i>C. insignis*</i>	Loreto
		<i>C. ocumarensis</i>	Madre de Dios y San Martin.
		<i>C. plaumanni</i>	Loreto, Madre de Dios.
		<i>C. pseudodiabolicus</i>	Loreto
		<i>C. paraignacioi</i>	Madre de Dios
		<i>C. hylas</i>	Región amazónica
	Hylas	<i>C. palpalis</i>	Región amazónica
		<i>C. pseudoheliconiae</i>	Madre de Dios y San Martin.
Mataemyia	---	<i>C. bricenoi</i>	Madre de Dios
		<i>C. daviesi</i>	Región amazónica
		<i>C. huaynacapaci</i>	Cajamarca
Unplaced	Carpenteri	<i>C. belemensis</i>	Loreto
		<i>C. carpenteri</i>	Loreto
Unplaced	Eublepharus	<i>C. eublepharus</i>	Loreto
Unplaced	Leoni	<i>C. fieldi</i>	Loreto
		<i>C. gabaldoni</i>	Loreto
Unplaced	Fluvialis	<i>C. leopoldoi</i>	San Martin
Unplaced	Reticulatus	<i>C. paucienfuscatus</i>	Región amazónica
Unplaced	Stigmalis	<i>C. fluviatilis</i>	Región amazónica
Culicoides	---	<i>C. hondurensis</i>	Cajamarca, Piura.
Diphaomyia	---	<i>C. jurbergi</i>	Región amazónica
Psychophaena	---	<i>C. venezuelensis</i>	Ancash
Drymodesmyia	---	<i>C. hitchcocki</i>	Región amazónica

**Culicoides* reconocido como vector del virus de Lengua Azul.

13. MÉTODOS DE CAPTURA

Las trampas de luz son un medio eficaz y productivo de recolección de dípteros hematófagos, tanto en cuanto a número de individuos capturados como a la diversidad de las especies representadas. Estas trampas se utilizan en colectas nocturnas y sirven para atraer insectos con fototropismo positivo. Una alta diversidad de insectos nocturnos es atraída a la luz y, aunque no se conoce con certeza la razón de esta atracción, se ha postulado que muchos de ellos se orientan en su vuelo tomando como referencia algún punto luminoso en el cielo, que puede ser la luna o las estrellas más cercanas a La Tierra (Barnard y Jones 1980; Baylis *et al.*, 1998)

13.1 Trampa Onderstepoort:

Desarrollada por el Instituto Veterinario de Onderstepoort (Sudáfrica) y manufacturada desde entonces por el Instituto de Ingeniería Agrícola de ese país (ARC-Institute for Agricultural Engineering). Esta trampa está equipada con un tubo de luz UV azulada de 30cm y 8W (Fig. 18). Se conecta directamente a la red eléctrica ya que posee transformador propio. Es una trampa robusta y pesada (4 kg). La succión de los insectos se realiza a través de un ventilador con una capacidad media de desplazamiento de aire de $204.5 \pm 9.47 \text{ m}^3/\text{min}$. (Venter y Meiswinkel, 1994; Goffredo y Meiswinkel, 2004).



Figura 18. Trampa Onderstepoort

Las capturas son recogidas en un bote de 500 ml. La recogida de insectos de gran tamaño se evita por una malla de poliéster de 2 mm de paso colocada alrededor de la fuente de luz. Este tipo de trampa se ha utilizado desde 1970 como herramienta en la monitorización y captura de Culicoides para aislamientos víricos en Sudáfrica (Meiswinkel *et al.*, 2004) y, desde 1996, se ha introducido en varios países de Europa como Italia (Goffredo y Meiswinkel, 2004), Grecia (Patakakis, 2004), Suiza (Cagienard *et al.*, 2006) y Francia (Baldet *et al.*, 2008; Balenghien, 2008).

13. 2 Trampa mini-CDC

Trampa manufacturada y distribuida por la Compañía John Hock (Gainesville, FL, EE.UU). Está compuesta por un tubo de luz U.V. azulada de 15 cm y 4 W de potencia. Se puede activar mediante corriente o batería (Fig. 19). Si se acciona a la corriente debe disponer de un transformador de 6 V, en el caso que la trampa posea célula fotosensible de activación/parada, o de 12 V, si carece de ella. Está fabricada en plástico y su peso es de 0.8 Kg. La succión de los insectos se realiza a través de un ventilador con una capacidad media de desplazamiento de aire de 11.06 m³/min (Chandler y Highton, 1975). Los insectos aspirados a través del ventilador son recogidos en un bote colector de 450 ml. La entrada de polillas e insectos de gran tamaño se evita mediante una rejilla metálica de diámetro de paso de 5 mm colocada entre la fuente de luz y el aspirador de la trampa. Se utiliza en Portugal (Capela *et al.*, 1993), EE.UU. (Smith y Mullens, 2003), España (Miranda *et al.*, 2004) y Bélgica (De Deken *et al.*, 2008).



Figura 19. Trampa succionadora tipo mini CDC (Alarcón, 2015)

En relación al uso de diferentes trampas, estudio llevados a cabo por Venter *et al.* (2009) indican una eficiencia menor en la captura de *Culicoides* empleando trampas mini CDC comparadas con trampas tipo Onderstepoort. Estas diferencias se deben a la fuente de luz mas potente usada por las trampas Onderstepoort, no obstante el gasto energético de estas, su instalación y costo las hace menos operativas que las mini CDC.

14. IMPORTANCIA DE LOS *Culicoides* spp. COMO VECTORES DE ARBOVIRUS

Actualmente, más de 50 arbovirus de importancia en la medicina veterinaria han sido aislados de *Culicoides* spp. muchos de ellos de la familia *Bunyaviridae* (20 virus), *Reoviridae*

(19 virus) y *Rhabdoviridae* (11 virus) (Mellor *et al.*, 200), destacando los virus: lengua azul (VLA), de la enfermedad hemorrágica epizootica (VEHE), de la peste equina africana (PEA), de Oropouche (ORO), de la estomatitis vesicular (VEV), de Schmallenberg (SBV), etc., cuya distribución geográfica está incrementándose debido al cambio climático y calentamiento global, generando la emergencia y/o reemergencia de estos agentes virales (Hunter, 2003).

Cuadro 5. Lista de agentes virales y parasitarios transmitidos por *Culicoides* spp.
(Adaptado de Borkent y Spinelli, 2007)

Agente	Vector	Hospedero	Localización
VIRUS			
Bunyavirus			
Oroupuche	<i>C. paraensis</i>	Perezosos, humanos *Anticuerpos en otras especies	Trinidad, Panamá, Perú y Brasil
Amanindeua	<i>C. paraensis</i>	Aves, marsupiales, roedores y primates	Brasil
Orbivirus			
Lengua azul	<i>C. insignis</i> , <i>C. pusillus</i> , <i>C. filarifer</i>	Rumiantes domésticos y silvestres	Austria, África, Asia, Europa sur, América del Norte, Central y Sur
Enfermedad hemorrágica	<i>C. sonorensis</i>	Rumiantes domésticos y silvestres	Austria, África, Asia, Europa sur, América del Norte, Central y Sur
Peste equina Africana	<i>Culicoides</i> spp.	Equidos	África, España, Portugal, India
Vesiculovirus			
Estomatitis vesicular (New Jersey)	<i>Culicoides</i> spp.	Desconocido	Brasil
FILAROIDEA			
<i>Dipetalonema caudispina</i>	<i>C. bollensis</i>	Primates	América del Sur
<i>Dipetalonema gracile</i>	<i>C. bollensis</i>	Primates	México, América Central y del Sur
<i>Dipetalonema marmosetae</i>	<i>C. furens</i>	Primates	América del Sur
<i>Dipetalonema perstans</i>	<i>Culicoides</i> spp.	Humanos y otros primates	América Central y del Sur

14.1 VIRUS OROPOUCHE (vORO)

El virus de Oropouche (vORO) es un miembro del grupo Simbu del género *Orthobunyavirus* transmitido por *C. paraensis* (Pinhairo *et al.*, 1981), este arbovirus es emergente en la región amazónica de Brasil, Perú y Venezuela (da Rosa *et al.*, 2017). OROV fue originalmente descrito en Trinidad (1955), y luego en Brasil cuando fue aislado de un perezoso en 1960 (*Bradypus tridactylus*) y después de un primate en 2005 (*Callithrix* sp.) Ocasiona la enfermedad febril conocida como fiebre de Oropouche, que puede presentarse con meningoencefalitis, cefalea, artralgia, escalofríos, náuseas y vómitos persistentes hasta 5-7 días, y en algunos pacientes la convalecencia puede demorar semanas (da Rosa *et al.*, 2017).

14.2 VIRUS DE PESTE EQUINA AFRICANA (PEA)

La Peste Equina Africana (PEA) es una enfermedad infecciosa viral que afecta a los équidos, transmitida por vectores biológicos, principalmente del género *Culicoides* (Mellor, 1993). El virus de la PEA (VPEA) pertenece a la familia *Reoviridae* y al género *Orbivirus*, habiéndose descrito nueve serotipos del VPEA (Scacchia *et al.*, 2009, MacLachlan y Guthrie 2010). La PEA es endémica en ciertas regiones de África, mientras que se han reportado epidemias aisladas en Egipto, España, Portugal, Pakistán y la India (Sánchez-Vizcaíno 2004). La PEA es causante de grandes pérdidas económicas en la industria equina de regiones afectadas debido a la alta mortalidad de animales y a las restricciones del comercio y de eventos ecuestres a nivel internacional (MacLachlan y Guthrie 2010).

14.3 VIRUS DE SCHMALLEMBERG (SBV)

El virus de Schmallenberg (SBV) es un virus ARN que muestra 97% de identidad con el virus Shamonda (SHAV), 71% de identidad con el virus Ain y 69% de identidad con el virus Akabane (AKAV) (Hoffmann *et al.*, 2012). El SBV forma parte del serogrupo Simbu de la familia *Bunyaviridae*, género *Orthobunyavirus* y es transmitidos por *Culicoides obsoletus*. En noviembre de 2011, un nuevo virus fue identificado por los investigadores de Friedrich Loeffler (FLI, Alemania), el cual había ocasionado una baja en la producción de leche, diarrea, fiebre y malformaciones congénitas en bovinos, ovinos y caprinos en Alemania, Francia y los Países Bajos (Hoffmann *et al.*, 2012; Van den Brom *et al.*, 2012).

14.4 VIRUS DE AKABANE (AKAV)

El virus de Akabane (AKAV) es un arbovirus del género *Orthobunyavirus*, del serogrupo Simbu y de la familia *Bunyaviridae* transmitido por *Culicoides oxystoma* (Hurogi *et al.*, 1987). Virus como Tinaroo, Sabo y Yaba-7 actualmente son considerados cepas o variedades del AKAV. El Virus de Akabane provoca epizootias y brotes esporádicos de

abortos, mortinatos y anomalías congénitas en los neonatos, los más afectados mueren o deben ser eutanasiados (Kono *et al.*, 2008). El AKAV está ampliamente distribuido en zonas tropicales y zonas en Australia, Asia Sur-Oriental, Asia Oriental, el Medio Oriente y África. En los últimos años ha producido brotes en Japón afectando a 200 bovinos en el 2006 (Elhassan *et al.*, 2014).

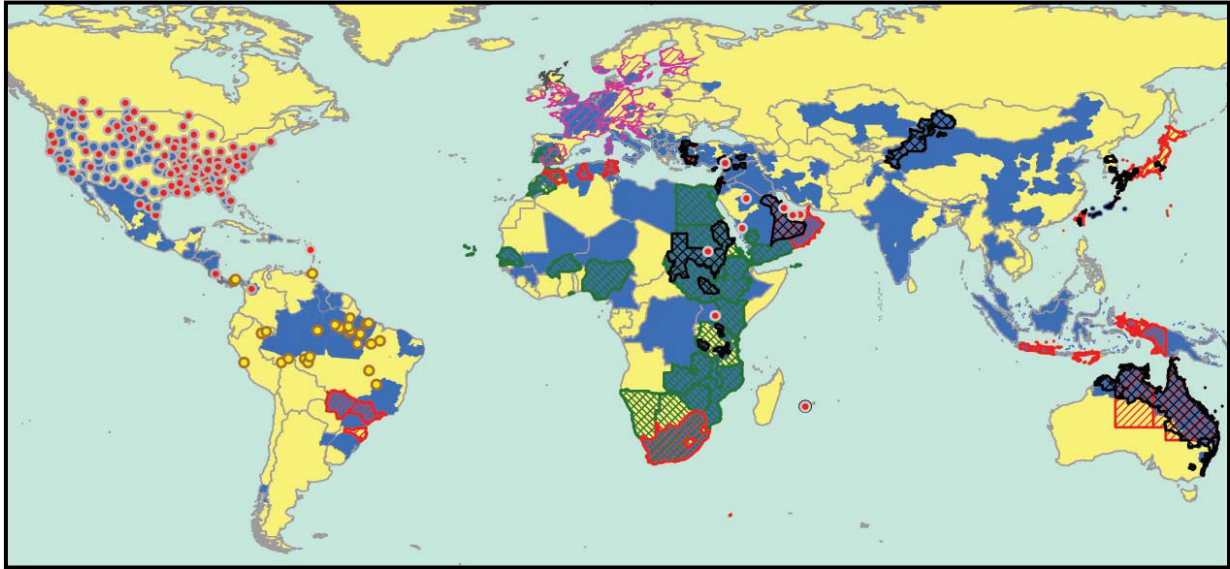
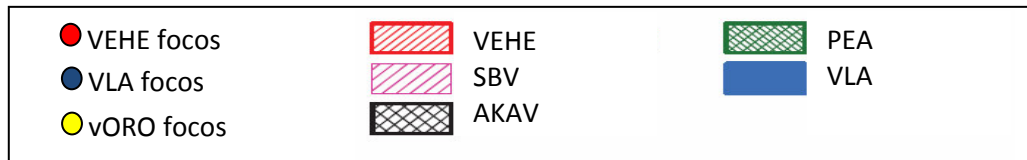


Figura 20. Distribución de los principales arbovirus transmitidos por *Culicoides* spp.
(Purse *et al.*, 2015)

(VEHE: Virus de la enfermedad hemorrágica epizootica; VLA: Virus de lengua azul; VORO: Virus de Oropouche; SBV: Virus de Schmallenberg; AKAV: Virus de Akabane; PEA: Virus de la Peste equina africana)



14. 5 VIRUS DE LA ENFERMEDAD HEMORRÁGICA EPIZOÓTICA (VEHE)

El virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (VEHE) pertenece al serogrupo *Orbivirus* de la familia *Reoviridae* (McLachlan y Osburn, 2004). Hasta la fecha 8 serotipos han sido reconocidos (Campbell y St-George, 1986) (Cuadro 6), atribuyéndose como el principal determinante de la especificidad del serotipo la proteína VP2 de la cápside externa, aunque la VP5, la otra proteína externa, también está implicada como un determinante secundario (Schwartz-Cornil *et al.*, 2008).

VEHE es una enfermedad infecciosa, generalmente de curso agudo caracterizada por hemorragias generalizadas y que suele causar una alta mortalidad en cérvidos y pérdidas de producción en la especie bovina, dependiendo del serotipo de virus de la EHE (VEHE) implicado. La EHE es considerada una enfermedad enzoótica en EEUU donde causa brotes

epidémicos en algunas poblaciones de ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Stallknecht y Howerth, 2004). Se han presentado brotes epidémicos de la enfermedad tanto en cérvidos como en bóvidos en Australia, Japón sudeste asiático, Sudáfrica y recientemente en Israel, Túnez y Argelia (Savini *et al.*, 2011).

Cuadro 6. Serotipos de VEHE reconocidos (Adaptado de Campbell y St George, 1986)

Serotipo
VEHE-1 New Jersey
VEHE-2 Alberta, Ibaraki y CSIRO 439
VEHE-3 Ib Ar 2619*
VEHE-4 Ib Ar33853
VEHE-5 CSIRO 157
VEHE-6 CSIRO 753
VEHE-7 CSIRO 775
VEHE-8 DPP 59

**El Serotipo VEHE-3 ha mostrado ser similar al serotipo VEHE-1 (Anthony *et al.*, 2009)*

Dos de los más importantes *Orbivirus* de ungulados transmitido por *Culicoides* son VEHE y el VLA los cuales están listados como “enfermedades notificables” a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2016), a continuación se describirá ampliamente a VLA.

15. VIRUS DE LENGUA AZUL

Historia del virus de lengua azul (VLA)

VLA fue primeramente descrito en África a fines del siglo XIX, aunque se estima que ocurrió hace más de 100 años. El primer reporte oficial se conoce luego de una importación de ganado ovino susceptible de raza Merino desde Europa a la provincia de El Cabo, en Sudáfrica (Howell y Verwoerd, 1971). Hutcherson en 1881 la llamó Catarro Epizootico de las ovejas creyendo que se trataba de una enfermedad causada por algún parásito intracorpúscular (Coetzee *et al.*, 2012). En 1902 Spreull propuso el nombre de Lengua Azul haciendo referencia a la traducción literaria de la denominación utilizada por los nativos, y posteriormente, en 1906, Sir Arnold Theiler demostró que era producida por un agente filtrable y por consiguiente, demostró que se trataba de un virus.

A mediados de ese mismo siglo Du Toit (1944) reveló que era transmitida por insectos *Culicoides* basándose en evidencia de incidencia estacional y espacial. Du Toit también demostró que la enfermedad podía ser causada mediante la inoculación de suspensión de *Culicoides* salvajes capturados a animales susceptibles y también que *Culicoides* que picaban animales enfermos, podían infectar luego animales sanos (Gorchs y Lager, 2001). Durante

mucho tiempo y hasta mediados del siglo XX, se creía que el VLA estaba confinado al sur del continente africano, idea que fue luego contradicha. Durante la segunda guerra mundial se diseminó fuera de África, y se conocieron brotes en Chipre, Israel, Portugal y España, entre otros países. Así cepas del virus de lengua azul fueron identificadas en muchas zonas tropicales y templadas del mundo desde una latitud de aproximadamente 40°N a 35°S. Sin embargo, actualmente el cambio climático y el calentamiento global están generando la propagación de *Culicoides*, lo cual ha incrementado la persistencia y diseminación del Virus de lengua azul hacia países donde no existían reportes de infección (Purse *et al.*, 2005).

16. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La familia *Reoviridae* está conformada por 15 géneros oficialmente reconocidos. Los virus miembros de esta familia poseen genomas compuestos por 9, 10, 11 ó 12 segmentos de ARN lineal de cadena doble. Además, la cápside posee de 2 a 3 cores con simetría icosaedral y un diámetro de 60 a 90 nm. El virus de lengua azul es el miembro prototipo del género *Orbivirus* de la familia *Reoviridae* (Cuadro 7) (Mertens *et al.*, 2005).

Cuadro 7. Relación de agentes virales del género *Orbivirus* según la ICTV, 2017 (Sombreado el virus de lengua azul) (ICTV, 2017)

Orden: No asignado		
Familia: <i>Reoviridae</i>		
Subfamilia:	<i>Sedoreovirinae</i>	
Género	<i>Orbivirus</i>	Especies del género <i>Orbivirus</i>
	<i>Rotavirus</i>	<i>Virus de Lengua azul</i>
	<i>Seadornavirus</i>	<i>African horse sickness virus</i>
	<i>Phytoreovirus</i>	<i>Changuinola virus</i>
	<i>Cardoreovirus</i>	<i>Chenuda virus</i>
	<i>Mimoreovirus</i>	<i>Chobar Gorge virus</i>
Subfamilia:	<i>Spinareovirinae</i>	
Género	<i>Orthoreovirus</i>	<i>Epizootic hemorrhagic disease virus</i>
	<i>Aquareovirus</i>	<i>Equine encephalosis virus</i>
	<i>Coltivirus</i>	<i>Eubenangee virus</i>
	<i>Mycoreovirus</i>	<i>Great Island virus</i>
	<i>Fijivirus</i>	<i>Ieri virus</i>
	<i>Idnoreovirus</i>	<i>Lebombo virus</i>
	<i>Oryzavirus</i>	<i>Orungo virus</i>
	<i>Cypovirus</i>	<i>Palyam virus</i>
	<i>Dinovernavirus</i>	<i>Peruvian horse sickness virus</i>

17. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

VLA es un virus sin envoltura, con un genoma de aproximadamente 19 200 pares de bases distribuidos en diez segmentos lineales de ARN de doble cadena (ARNdc), que contiene 57% AU y 43% GC, con secuencias terminales conservadas en los extremos 5' y 3' (GUUAAA en 5' y ACUUAC en 3' de la cadena positiva). Los 10 segmentos de ARNdc son empaquetados dentro de una capa triple icosaédrica de proteínas (aproximadamente 90 nm de diámetro) (Schwartz-Cornil *et al.*, 2008) (Fig. 21 y Cuadro 8).

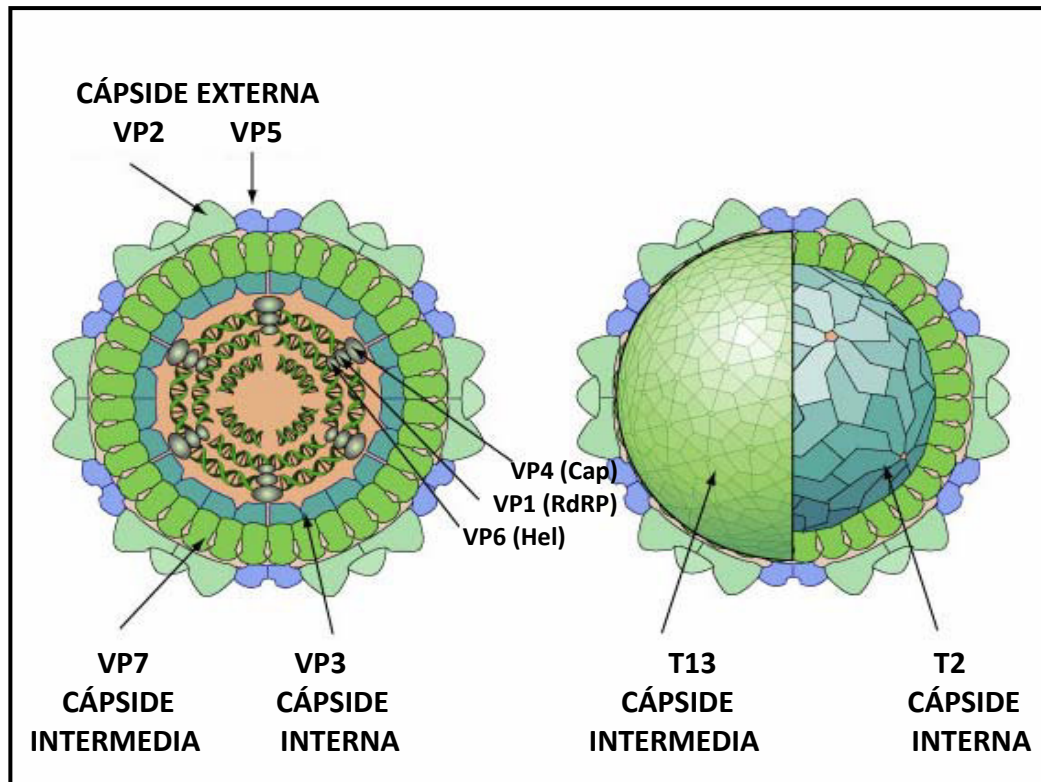


Figura 21. Proteínas del cápside interne, intermedia y externa del virus de Lengua Azul

18. PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

18.1 VP2

La proteína VP2 es un trímero en forma de "triskelion" (tres espirales entrelazados), ésta es la responsable de la unión al receptor celular, hemaglutinación e de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes específicos. La VP2 recombinante tiene una fuerte afinidad por la Glicoporina A, un componente de la sialoglicoproteína presente en los eritrocitos, una interacción que podría explicar la relación de VLA con los eritrocitos (Hassan y Roy, 1999). La especificidad de la proteína VP2 en la prueba de virus neutralización (VN), ha sido útil para identificar los 27 serotipos existentes a nivel mundial (Jenckel., 2015). Comparaciones

filogenéticas de VP2 muestran una perfecta correlación entre la variación de secuencia en el segmento 2 (Seg-2 y el serotipo de VLA). Estos serotipos se agrupan en 10 linajes evolutivos, reconocidos como nucleotipos (A-J). Asimismo, comparaciones de la VP2 revelaron variaciones significativas entre cepas del mismo serotipo derivadas de diferentes aéreas geográficas, con hasta un 30% de secuencia de nucleótidos diferentes dentro del mismo serotipo, denominados como topotipos (Maan *et al.*, 2007)

18.2 VP5

En contraste con la VP2, la VP5 es más conservada pero muestra cierto grado de variaciones que reflejan el origen geográfico de la cepa viral. Además, la VP5 ha demostrado intervenir en la penetración de la membrana para la liberación de partículas virales de los compartimentos endosómicos (Hassan *et al.*, 2001). Análisis de la estructura proteica de la VP5 muestran que está formada por dominios similares a proteínas de fusión "clase I" de los virus envueltos. Por lo que, la VP5 sufre un cambio conformacional ante la variación del pH, cambios que permiten la fusión de la membrana y la formación de un sincitio. La formación de sincitio por la VP5 se inhibe en presencia de VP2 cuando se expresa en una membrana anclada (Forzan *et al.*, 2004).

18.3 LAS PROTEÍNAS DEL CORE MAYOR: VP3 y VP7

La VP3 y en menor grado la VP7 son proteínas conservadas que desempeñan un papel importante en la integridad estructural del core viral. Estas expresan determinantes antigénicos específicos del serogrupo (Anthony *et al.*, 2007). Es importante destacar que los cores son poco infecciosos o incluso no infecciosos en células de mamíferos, pero son al menos 100 veces más infecciosos para células de adultos *Culicoides*. La VP7 interviene en la adherencia, unión y la penetración en células de insecto en ausencia de VP2 o VP5. El complejo VP3 / VP7 protege el ARNdc de mecanismo de defensa intracelular, evitando así la activación del Interferón tipo I (IFN) (Mertens *et al.*, 1996).

18. 4 LA PROTEÍNAS DEL COMPLEJO TRANSCRIPSIONAL: VP1, VP4 y VP6.

La VP1 es la ARN polimerasa dependiente de ARN (segmento 1), la cual está presente en una relación molar baja (Aproximadamente 12 copias por partícula), esta tiene una actividad óptima de 27 °C a 37°C, permitiendo la replicación eficiente en insectos y células de mamíferos. La VP4 actúa como enzima de capping, actuando sobre el ARNm temprano de VLA, de esta manera estabiliza el ARNm y permite su eficiente traducción. Finalmente la proteína VP6 tiene función de Helicasa, lo cual permite el desenrollamiento del ARNdc y la formación de templados para la replicación viral (Roy, 2008).

Cuadro 8. Segmentos del ARNdc de VLA y función de sus proteínas estructurales y no estructurales (Rao *et al.*, 2017)

Segmento (Tamaño en pb)	Proteína	Subunidades por virion	Función
1 (3954)	VP1 (Pol)	10-12	ARN polimerasa dependiente de ARN
2 (2926)	VP2	180	Proteína de unión al receptor celular e ingreso
3 (2770)	VP3 (T=2)	120	Proteína estructural del sub-core o cápside interna
4 (1981)	VP4 (Cap)	5-24	Enzima de capping
5 (1769)	NS1	NA	Potenciador de traducción de proteínas virales
6 (1638)	VP5	360	Proteína de permeabilización de la membrana
7 (1156)	VP7 (T=13)	780	Proteína estructural del sub-core o cápside interna, y proteína de unión al receptor en células de <i>Culicoides</i>
8 (1124)	NS2	NA	Involucrado en la formación de corpúsculos de inclusión y concentrador de componentes del core
9 (1046)	VP6	37/72	Inhibidor de la respuesta mediada por Interferón.
10 (822)	NS3 NS3a	NA	Involucrado en la salida celular, puede desorganizar la estabilidad de la membrana celular

19. PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES

19.1 NS1: La NS1 es una proteína de formación de túbulos altamente conservada que se sintetiza en el citoplasma desde la etapa muy temprana de replicación, la cual es capaz de promover específicamente la expresión de proteínas de VLA, actuando como un regulador positivo de la traducción (Boyce *et al.*, 2012), ya que actúa de manera análoga a la proteína de unión a poliA del hospedero (Vende *et al.*, 2000).

19.2 NS2: La NS2 es el principal constituyente de los cuerpos de inclusión (CI) observados en las células infectadas, principalmente en las proximidades del núcleo. Además la NS2 se une al ARNcs viral y se hidróliza de nucleótidos trifosfatos a nucleótidos monofosfatos, estas dos propiedades implican que la NS2 podría estar implicado de alguna manera en la

19.3 NS3 y NS3a: Estas proteínas actúan como viroporinas, facilitando la liberación de virus por inducción de la permeabilización de la membrana en células de mamíferos, mientras que en células de insecto la NS3 se une a la proteína celular Tsg101, permitiendo que las partículas de VLA sean liberadas por gemación, de esta manera VLA no genera efecto citopático (Schwartz-Cornil *et al.*, 2008).

El proceso de producción de partículas es exponencial durante las 8 y 24 horas después de la infección (Fig. 22).

20.2 PENETRACIÓN Y DESNUDAMIENTO: Tras el proceso de adherencia las partículas virales se internalizan a través de una endocitosis dependiente de Clatrina. En el endosoma temprano, la VP2 se disocia de la cápsida externa, donde la acidificación induce a la VP5 a una fusión con la membrana endosomal, liberando el core transcripcionalmente activo al citoplasma celular. Como otros miembros de la familia *Reoviridae*, la transcripción del genoma de VLA se realiza dentro de la citoplasma de las células infectadas (Forzan *et al.*, 2007).



20.3 TRANSCRIPCIÓN: Dentro del core de VLA, las moléculas de VP1 (ARN polimerasa dependiente de ARN) transcriben moléculas de ARN complementarios (ARNcs) de sentido positivo de cada uno de los diez segmentos. Estas moléculas de ARN son estabilizados por la actividad guanilil-transferasa y transmetilasa de la VP4 (enzima de capping). Los ARNm generados sirven como plantillas para la traducción de proteínas virales, lo cual ocurre dentro de dos horas después de la infección penetración. El ARN viral positivo es transportado a los corpúsculos de inclusión donde ocurre la encapsidación de los diferentes segmentos dentro del core interno (VP3). Luego la VP1 sintetiza el ARN de cadena negativa para producir ARNdc de cada segmento (Patel y Roy, 2014).

20.4 ENSAMBLAJE: Se ha propuesto que cada segmento ARNdc se asocia independientemente con un complejo de transcripción diferente (VP1, VP4 y VP6) situado en el lado interno de VP3. Los subcores de VP3 son relativamente inestables, por lo que es necesario la adición de trímeros VP7, dando lugar a cores más rígidos y estables, y posteriormente las proteínas de la cápside externa VP2 y VP5 son añadida (Patel y Roy, 2014).

20.5 SALIDA: Para el tráfico de las partículas virales dentro del citoplasma la VP2 interactúa con la vimentina, y finalmente la NS3 actúa como una viroporina generando la desestabilización de la membrana, ocurriendo la muerte celular y la lisis celular en células de mamíferos para la liberación de los viriones. En el caso de células de insecto los viriones son liberados por un mecanismo de gemación (Bhattacharya *et al.*, 2007)

21. RANGO DE HOSPEDEROS

El virus de la Lengua Azul afecta a una gran variedad de rumiantes domésticos y salvajes como ovinos, cabras, bovinos, búfalos, ciervos, antílopes, ovino cimarrón y alces de América del Norte. La manifestación clínica se observa con frecuencia en los ovinos, a veces en las cabras, y rara vez en los bovinos. Una afección grave también puede ocurrir en algunos rumiantes salvajes como el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el berrendo (*Antilocapra americana*) y en el ovino cimarrón del desierto (*Ovis canadensis*).

22. TRANSMISIÓN

El VLA es transmitido biológicamente por ciertas especies del género *Culicoides*, de las 1400 especies registradas solo 30 han sido involucradas como vectores (Cuadro 9 y Fig. 23), en las cuales no se ha encontrado aún evidencia de transmisión vertical del virus. La transmisión vertical en vertebrados, aunque posible, no sería importante en la epidemiología de la infección (Lager, 2004); y existe poca evidencia de transmisión por contacto directo o indirecto (Greiner *et al.*, 1999). El virus no es transmitido por carne, leche y derivados pero se debe remarcar que

los machos infectados con VLA pueden eliminar el virus por semen durante el período de viremia (Gibbs *et al.*, 1993)

Cuadro 9. Relación de las 30 especies de *Culicoides*, que juegan un rol en la transmisión del virus de Lengua Azul a nivel mundial. Las especies en negrita han sido demostradas como vectores en campo (Meiswinkel et al., 2004)

Subgénero	Grupo	Especie
<i>Avaritia</i> Fox, 1955	Imicola	<i>C. imicola</i> <i>C. brevitarsis</i> <i>C. bolitinos</i>
	Obseletus	<i>C. obsoletus</i> <i>C. scoticus</i>
	Orientalis	<i>C. fulvus</i> <i>C. dumdumi</i> <i>C. orientalis</i>
	Grahamii	<i>C. actoni</i>
	Pusillus	<i>C. pusillus</i>
	Suzukii	<i>C. waddai</i> <i>C. brevipalpis</i>
	Gulbenkiani	<i>C. gulbenkiani</i> <i>C. tororoensis</i>
<i>Culicoides</i> Latreille, 1809	Pulicaris	<i>C. pulicaris</i> <i>C. magnus</i>
<i>Silvicola</i> Mirzaeva y Isaev, 1990	Cockerellii	Especie desconocida
<i>Monoculicoides</i> Khalaf, 1954	Variipennis	<i>C. sonorensis</i>
	Nubeculosus	<i>C. nubeculosus</i> <i>C. pucticollis</i>
<i>Remmia</i> Glukhova, 1977	Schultzei	<i>C. oxystoma</i> <i>C. nevilli</i> Especies desconocidas
<i>Hoffmania</i> Fox, 1948	Guttatus	<i>C. insignis</i> <i>C. filarifer</i>
	Peregrinus	<i>C. peregrinus</i>
	Milnei	<i>C. milnei</i>
<i>Haematomyidium</i> Goeldi, 1905	Grupo desconocido	<i>C. stellifer</i>
<i>Oecacta</i> Poey, 1853	Furens	<i>C. furens</i>
Subgénero desconocido	Grupo desconocido	<i>C. trilineatus</i>

Los 27 serotipos presentes del VLA en distintas regiones del mundo tienen características virológicas diferentes y parecerían mantenerse en ecosistemas estables. A su vez, diferentes serotipos del VLA se encuentran en distintas zonas geográficas aunque no hay una

correlación perfecta entre estas variables, además, el creciente movimiento de animales y vectores está homogeneizando la distribución global de serotipos. Por otro lado, también se cree que la presencia de diferentes serotipos virales y especies de *Culicoides* en diferentes áreas sugeriría que la relación virus-vector es importante para establecer la incidencia de la enfermedad (Wilson, 2000)

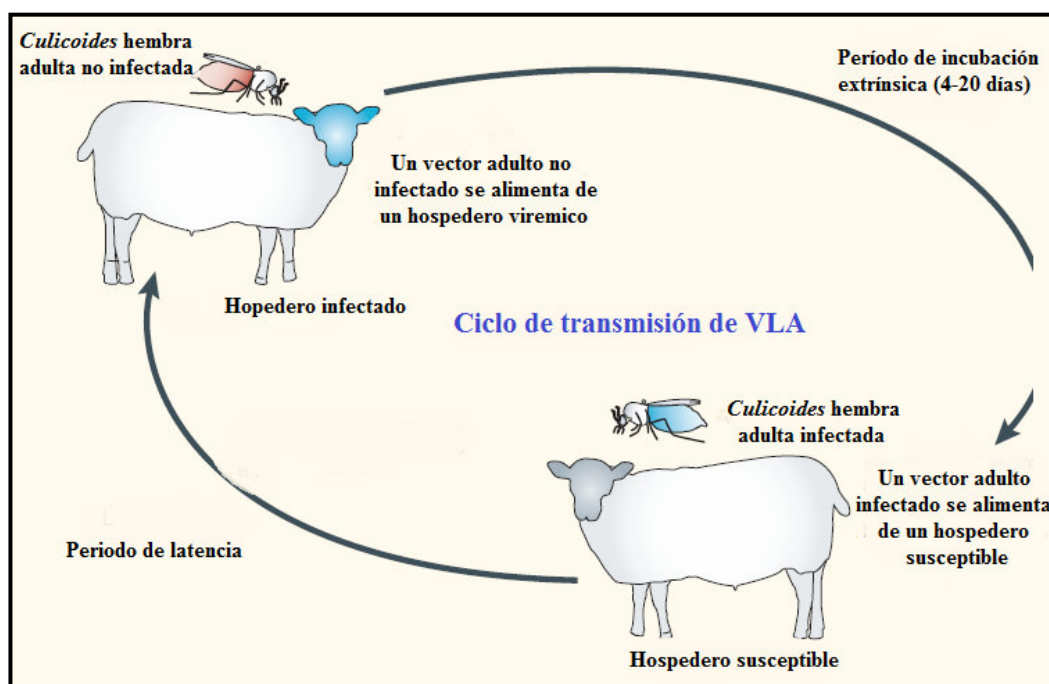


Figura 23. Ciclo de transmisión del VLA por mosquitos del género *Culicoides* (Modificado de Purse *et al.*, 2015)

23. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Se sabe que la distribución de VLA es global, ha sido detectado en todos los continentes excepto el territorio antártico. La infección por el VLA es endémica en áreas tropicales y templadas de la mayor parte del mundo, su detección coincide con la distribución de vector competente infectivo (Cuadro 10). El VLA existe en una amplia franja que incluye regiones entre las latitudes 40°N y 35°S (quedando la Argentina incluida desde la frontera norte hasta la mitad de la provincia de Buenos Aires, norte de La Pampa y sur de Mendoza) (Fig. 24). Sin embargo, estos límites han sido superados en regiones de Asia, Norteamérica y Europa donde la infección por el VLA ha sido detectada hasta los 50°N (Ruder *et al.*, 2015).

La distribución de vectores y serotipos del VLA difiere a través del mundo, de modo que vectores específicos coexisten con determinadas cepas en ecosistemas relativamente estables. La distribución global de los 27 serotipos descriptos del virus no es uniforme y en los

últimos años ha sufrido cambios drásticos probablemente como consecuencia del cambio climático global y el movimiento de animales, muchas veces poco regulado (Carpenter, 2009).

Cuadro 10. Localización de vectores *Culicoides* del virus de lengua azul, sombreado el principal vector en América del Sur (Meiswinkel *et al.*, 2007)

Vector	País /Continente
<i>C. imicola</i>	África, Europa Mediterránea
<i>C. sonorensis</i>	América del norte y México (norte)
<i>C. insignis</i>	América Central y del Sur
<i>C. brevitarsis</i> , <i>C. wadai</i> , <i>C. fulvus</i>	Sudeste de asia
<i>C. brevitarsis</i> , <i>C. wadai</i>	Australia, Java
<i>C. obsoletus</i> , <i>C. pulicaris</i>	Europa Central y Sur
<i>C. dewulfi</i> , Complejo obsoletus	Europa Norte

En América del norte destacan los serotipos 1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 17, 19, 22 y 24; mientras que en América Central y el Caribe los serotipos 1, 3, 4, 6, 8, 12 y 17 (Maclachlan *et al.*, 2010). Sin embargo, en América del Sur, la información sobre VLA es limitada, evidencia serológica ha sido reportada en Argentina (Puntel *et al.*, 1999), Brasil (Castro *et al.*, 1992; Lage *et al.*, 1996), Ecuador (Lopez *et al.*, 1985) y Chile (Tamayo *et al.*, 1985). Asimismo, mediante técnicas serológicas los serotipos determinados en Brasil son el 4, 6, 14, 17, 19 y 20 (Groocock y Campbell, 1982); en Colombia el 12, 14 y 17 (Homan *et al.*, 1985), en Guyana el 14 y 17; y en Suriname el 6, 14 y 17 (Gumm *et al.*, 1984). Brasil y Argentina son los únicos países de América del Sur donde VLA ha sido aislado e identificado como serotipo 12 (Brasil) y 4 (Argentina) (Clavijo *et al.*, 2002; Legisa *et al.*, 2013).

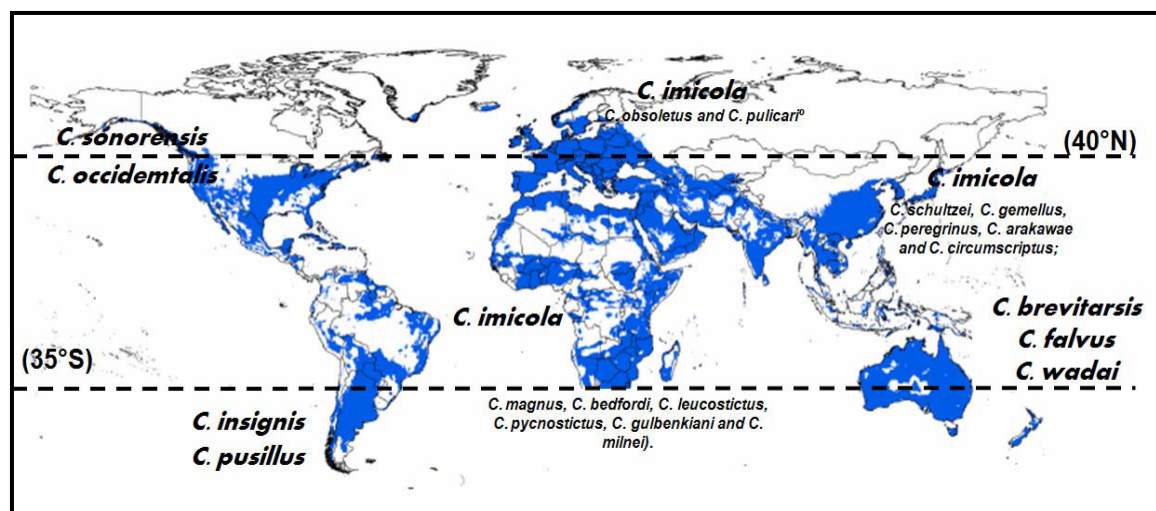


Figura 24. Distribución el virus de Lengua azul y sus vectores a nivel mundial (Modificado de Samy y Peterson, 2016)

En el Perú, la presencia VLA solo ha sido demostrada serológicamente en ovinos, camélidos y animales silvestres de áreas tropicales y subtropicales. Rosadio *et al.*, (1984) reportó una seroprevalencia de 55.9% del serogrupo Orbivirus en 34 carneros aparentemente sanos de tres regiones geográficas diferentes del país (norte, centro y sur), Esto también fue determinado en huanganas de labio blanco (*Tayassu pecari*) de Madre de Dios, las cuales mostraron una seropositividad de 29.2% para Orbivirus y de 7.5% para VLA (Rivera *et al.*, 2013).

24. SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES EN EL GANADO OVINO

Los ovinos muestran manifestaciones clínicas diversas, que van desde infecciones subclínicas o enfermedades leves, a agudas e incluso enfermedad mortal. Por lo general, la viremia es detectable alrededor de 3-5 días después de la infección (Foster *et al.*, 1991). Los signos clínicos incluyen pirexia, salivación (Fig. 25), taquipnea, fiebre, descarga nasal serosa a sanguinolenta y letargo. Las alteraciones patológicas principales son lengua cianótica (Fig. 25), edema generalizados (Fig. 24), hemorragias especialmente en los ganglios linfáticos, los pulmones, corazón y los músculos esqueléticos y/o necrosis de las superficies mucosas en la cavidad naso-oral y cojera con hiperemia del rodete coronario (MacLachlan *et al.*, 2008).



Figura 26. Edema mandibular (Veronesi *et al.*, 2010)



Figura 25. A) Severa salivación, dificultad respiratoria y letargo; B) Lengua cianótica (Veronesi *et al.*, 2010)

Las lesiones presentes en el examen post-mortem puede incluir hiperemia, hemorragias, erosión y ulceración de la mucosa de la parte superior el tracto gastrointestinal (cavidad oral, esófago, preestómagos), edema facial y submandibular, hemorragia de los ganglios linfáticos y del tejido subcutáneo, y necrosis del músculo esquelético y cardíaco (MacLachlan *et al.*, 2009).

Los animales que sobreviven pueden desarrollar dermatitis crónica y lesiones vesiculares y erosivas en las superficies interdigitales de las mucosas. La panleucopenia alcanza su máximo en el día siete a ocho después de la infección y afecta a todos los linfocitos, los linfocitos T (CD8+) especialmente (Schwartz-Cornil *et al.*, 2008)

25. SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES EN EL GANADO BOVINO

El ganado bovino infectado por lo general no desarrolla signos clínicos evidentes, siendo importantes reservorios del virus, sin embargo pueden manifestar cierta reacción de hipersensibilidad mediada por IgE. La cepa de VLA serotipo 8, la cual ha invadido el norte de Europa, es inusual debido a que el ganado infectado también ha desarrollado signos clínicos (Schwartz-Cornil *et al.*, 2008). Las lesiones pueden incluir ulceración severa y extensa de la mucosa oral y los pezones (Fig. 27), rinitis y mucohemorrágica con descarga nasal, epífora (fig. 26) e inflamación periocular y edema en las extremidades (Thiry *et al.*, 2006; Elbers *et al.*, 2008).

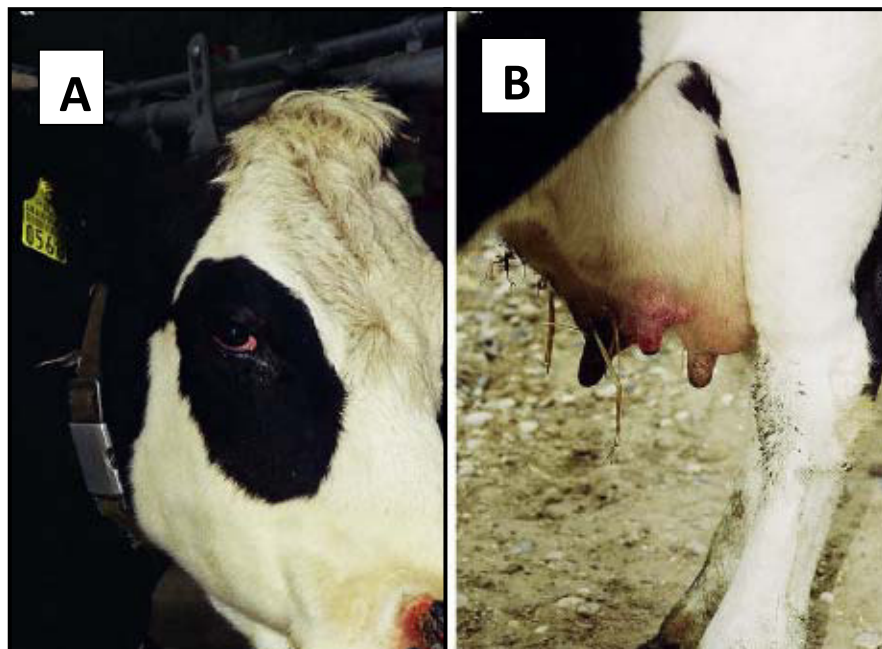


Figura 27. A) Epifora y conjuntivitis; B) Ulceración de pezones (MacLachlan *et al.*, 2009)

26. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

El serogrupo del virus de la lengua azul (VLA) incluye 27 serotipos, que pueden dividirse en distintos topotipos dependiendo del origen geográfico. El genoma del VLA consiste en 10 moléculas de ARN bicatenario, que codifican para 7 proteínas estructurales y 4 no estructurales. VP2 y VP5 son dos proteínas variables localizadas en la cápside externa del virión que determinan la variabilidad antigénica del virus y el serotipo. La VP7 es el antígeno inmunodominante principal del serogrupo y se usa generalmente para la identificación del serogrupo de la lengua azul mediante ensayos serológicos (Anthony *et al.*, 2007).

26.1 INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR (prueba prescrita para el comercio internacional)

La prueba inmunodifusión en gel de agar IGDA detecta anticuerpos anti-VLA es de desarrollo simple y el antígeno utilizado en la prueba es relativamente fácil de generar. Desde 1982, la prueba ha sido el procedimiento estándar de ensayo para controlar el movimiento internacional de rumiantes (Pearson *et al.*, 1985). Sin embargo, una de las desventajas de la IGDA utilizada para VLA es su falta de especificidad, por la que puede detectar anticuerpos contra otros Orbivirus, en particular los del serogrupo EHD. Por tanto, los sueros positivos por IGDA deben ser probados de nuevo utilizando una prueba específica para el serogrupo VLA. La falta de especificidad y la subjetividad que se ejerce durante la lectura de los resultados ha promovido el desarrollo de procedimientos basados en ELISA para la detección específica de anticuerpos anti-BTV (Gorman, 1986; Ristow *et al.*, 1988).

26.2 ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

La prueba competitiva ELISA, o prueba ELISA bloqueante para VLA, se desarrolló para medir anticuerpos específicos contra VLA sin detectar anticuerpos de reacción cruzada con otros Orbivirus. La especificidad es el resultado de utilizar uno de varios Anticuerpos monoclonales con reactividad al serogrupo VLA, como MAb-3-17-A3 (Anderson, 1984)) o MAb 20E9 (Lelli *et al.*, 2003). Los anticuerpos proceden de varios laboratorios y, aunque son diferentes, todos parecen unirse a la región amino-terminal de la principal proteína de la cápsida, VP7. En la prueba C-ELISA, los anticuerpos de los sueros de ensayo compiten con los MABs para unirse al antígeno. La sensibilidad diagnóstica y la especificidad de esta prueba se estiman en 87.8% (95% IC: 85.1-91.1) y 98.2% (95% IC: 96.3-99.6) respectivamente, basadas en un análisis bayesiano de muestras de campo de animales con un status infeccioso desconocido durante la epidemia de VLA 8 en Bélgica (Vandenbussche *et al.*, 2008).

26.3 AISLAMIENTO VIRAL

Se puede llevar a cabo el aislamiento del virus en huevos de pollo embrionados seguido de entre uno y tres pasajes ciegos (Bréard *et al.*, 2003). Los huevos inoculados se incuban durante 5 días a 35°C y se examinan diariamente utilizando un ovoscopio. Los embriones que mueren entre 2 y 5 días tras la infección se homogenizan individualmente en 10 volúmenes de Eagle medium y se clarifican por centrifugación para ser inoculados en células de riñón de hamster bebé (BHK-21) (Bréard *et al.*, 2003).. Las monocapas de células se incuban durante cinco días a 37°C en 5% CO₂ con humedad, y se observan regularmente para comprobar la aparición de efecto citopatogénico (ECP). Si no aparece el ECP, se realiza un segundo pasaje en cultivo de células después de congelarlas y descongelarlas. El virus se puede identificar utilizando un test de neutralización de virus (Bréard *et al.*, 2003).

26.4 RT-PCR

La detección del genoma viral por RT-PCR es un método rápido y conveniente para la detección del ARN del VLA. Se han desarrollado varios protocolos de RT-PCR que detectan los segmentos 1, 2, 3, 6, 7 ó 10 en los últimos 20 años (Billinis *et al.*, 2001; Zientara *et al.*, 2002; Aradaib *et al.*, 2003; Shawn *et al.*, 2007). Estos tests están reconocidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), que recomienda la PCR anidada para amplificar el segmento 5 del VLA (Toussaint *et al.*, 2005). RT-PCR suele tener más sensibilidad que el aislamiento del virus y puede dar un resultado positivo aún varias semanas después de la infección (MacLachlan *et al.*, 2004). Los métodos convencionales de RT-PCR requieren electroforesis en gel de agarosa, lo que limita el número de muestras que se pueden analizar en un día. Durante los últimos tres años, se han desarrollado los ensayos cuantitativos en tiempo real por RT-PCR (RT-qPCR) para la detección de ciertas vacunas y/o cepas de VLA. Recientemente se han descrito dos ensayos universales RT-qPCR que permiten la detección de todos los serotipos de VLA (Shawn *et al.* 2007)

27. IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD DE LENGUA AZUL

La enfermedad de Lengua Azul (ELA) es una enfermedad de declaración obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) de notable preocupación socio-económica y de gran importancia en el comercio internacional de animales y de productos animales. Antes de 1998, la ELA se consideraba una enfermedad exótica en Europa. Entre 1998 y 2005 al menos seis cepas de virus pertenecientes a cinco serotipos (VLA-1, VLA-2, VLA-4, VLA-9 Y VLA-16) han estado continuamente presentes en la cuenca mediterránea. Durante los brotes de ELA

en países europeos más de 800,000 cabezas de ovinos fueron afectados, brotes causado por un solo serotipo del VLA; en el 2006-2007 en Bélgica ocasionó pérdidas por 180 millones de Euros al año (Tabachnick, 1996; Tatem *et al.*, 2003). Desde Agosto de 2006, VLA-8 ha causado un brote epizoótico grave e inesperado de ELA en el norte de Europa. La recrudescencia, la extensión de las infecciones por VLA-8 en el norte de Europa durante 2007 sugieren que los cambios medioambientales por el cambio climático y calentamiento global, han generado la propagación de vectores *Culicoides* y de las agentes virales que ellos transmiten.

En el Perú, si bien no se ha detectado aún la ELA, existe información serológica en ovinos y en algunos animales silvestres de Madre de Dios, Pucallpa y Piura. Además, se ha identificado la presencia de *C. insignis*, especie vector en las regiones tropicales y subtropicales del América del Sur. Asimismo, el Perú posee una geografía compleja con valles interandinos y zonas andinas donde se desarrolla la ganadería, las que podría estar en riesgo de ser afectada por agentes virales emergentes transmitidos por insectos, cuya migración desde zonas tropicales y subtropicales a mayores altitudes es favorecida por el calentamiento global y cambio climático como lo menciona LorcaOró *et al.*, (2014). Se considera muy importante conocer la distribución y fenología de los *Culicoides* spp descritos como potenciales vectores del virus, la prevalencia del VLA en ovinos y otros rumiantes a nivel nacional e identificar el o los serotipos del virus presente en el país.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TIEMPO DEL ESTUDIO

El estudio fue realizado en tres etapas:

La primera etapa (Setiembre 2016): se realizó la obtención de muestras de sangre de ovino para el análisis serológico a fin de seleccionar las granjas con ovinos seropositivos a VLA.

La segunda etapa (Noviembre del 2016): consistió en la captura de mosquitos para determinar las especies de *Culicoides* spp. más frecuentes en las granjas seleccionadas.

La tercera etapa (Octubre del 2017): se llevó a cabo la captura de mosquitos para su identificación rápida y procesamiento en campo, así como la obtención de muestras de sangre de ovino. Ambos para la detección molecular del virus de Lengua Azul.

3.2. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras de sangre fueron obtenidos de granjas de ovinos de pelo de la localidad de Santo Rosa de Lima, del distrito de Campo Verde, provincia Coronel Portillo ubicado a 50 km de la ciudad de Pucallpa, Ucayali (8°33'50.7"S - 74°55'09.7"O), a una altitud media de 193 msnm.

Los insectos fueron capturados de granjas de ovinos de pelo seropositivos al virus de Lengua Azul, de la misma localidad. Las condiciones ambientales se caracterizaron por la presencia de arbustos, humedales, una vivienda y charcos, presencia de caballos y aves de corral; y la temperatura promedio osciló entre 20 y 35°C, sin lluvias durante los períodos de captura.

El proceso de colección de los insectos capturados se realizó en el Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura de Pucallpa (IVITA-PUCALLPA), ubicado a 8 km de la zona de captura.

El análisis serológico se realizó en la Sección de Virología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología (SV-LMP) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM).

La identificación de especies de *Culicoides* se realizó en la SV-LMP con el apoyo de la sección de Entomología del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión, Facultad de Medicina UNMSM y el Instituto de Ecología (INECOL) de Xalapa, Veracruz-México. El análisis molecular se realizó en la Unidad de Diagnóstico Molecular de la SV-LMP.

3.3. PRIMERA ETAPA

3.3.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO DE LOS OVINOS

Un requisito importante para determinar el área de captura de los insectos fue identificar granjas de ovinos que fueran positivos a anticuerpos contra el VLA. Por tal motivo previo a la captura de insectos se obtuvo muestras de sangre de ovinos de cada granja para el análisis serológico, además se realizó el examen clínico de las mucosas y patas en busca de lesiones en el borde coronario, las que no fueron observadas en las ovejas examinadas. En total se colectaron 46 muestras de suero procedentes de 3 granjas.

Las muestras de sangre de los ovinos fueron obtenidas por punción de la vena cefálica ó yugular utilizando tubos al vacío sin anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas a 800xg por 5 minutos, los sueros fueron guardados en viales y conservados a -20 °C hasta su procesamiento.

3.3.2. ANÁLISIS SEROLÓGICO

Para el análisis serológico, se utilizó un kit comercial (Kit Bluetongue virus antibody test) (VMRD, USA) para la prueba de inmunodifusión en gel agar (IDGA), con el fin de detectar anticuerpos contra el género *Orbivirus* (Virus de Lengua Azul (VLA) y Virus de la Enfermedad Hemorrágica Epizootica (VEHE)), siguiendo las instrucciones del manual del fabricante (ANEXO 1)

Los sueros positivos y débil positivos a IDGA fueron analizados por la prueba de ELISA competitiva, Bluetongue Virus antibody Test cELISA (VMRD, USA), basada en un anticuerpo monoclonal competitivo, el cual es específico para distinguir anticuerpos contra el virus de Lengua Azul. El desarrollo de la prueba fue siguiendo las especificaciones del fabricante (ANEXO 2).

3.4. SEGUNDA ETAPA

3.4.1 CAPTURA Y TRANSPORTE DE *Culicoides* ADULTOS

En las granjas, seropositivas, se realizaron capturas de insectos en el mes de Noviembre de 2016, utilizando cinco trampas de luz succionadoras tipo mini CDC (Centers Disease Control and Prevention) con luz ultravioleta (BELTEC, Perú). Las trampas fueron operadas durante tres días consecutivos, desde el anochecer (18:00 horas) hasta el amanecer (6:00 horas) del día siguiente. Éstas fueron ubicadas en las ramas de los árboles a una altura de 1.5 - 2 m del suelo en las proximidades del área de descanso de los ovinos y separadas al menos en 50 m.

Los insectos capturados fueron llevados al IVITA-Pucallpa para su colección y conservación en frascos de boca ancha y etanol al 70%, según el protocolo del Centro Nacional de Referencia para Enfermedades Exóticas en Italia (CESME: *Centro Studi Malattie Esotiche* (Goffredo y Meiswinkel, 2004). Finalmente fueron llevados a la FMV-UNMSM para su clasificación taxonómica.

3.4.2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE *Culicoides* ADULTOS

La separación de los especímenes pertenecientes al género *Culicoides* se realizó con la ayuda de un estereomicroscopio (LEICA S6D) en base a criterios morfológicos como: 1) ojos grandes que inician en la cara anterior de la cabeza y cubren en lateral y llegan hasta la frente, 2) antenas con más de 13 segmentos en forma de cadena, y 3) alas membranosas con o sin patrones de pigmentación específica, entre otros (Borkent y Spinelli, 2007). Posteriormente se

diferenció hembras de machos considerando la presencia de antenas pilosas y espermateca, y la característica del último segmento abdominal (Borkent y Spinelli, 2007).

Para la determinación taxonómica se utilizó el Atlas de fotografías de las alas de especies neotropicales de *Culicoides* de Wirth *et al.* (1988), además de claves dicotómicas y descripciones de las especies según Spinelli (1993); Spinelli *et al.*, (2005), Borkent y Spinelli (2007), Perruolo, (2009), de Sousa Farias *et al.*, (2016); las cuales se basan principalmente en los patrones de pigmentación alar, parámetros morfométricos, morfología de la genitalia y de los palpos. Finalmente, las especies identificadas fueron incluidas en subgéneros y/o grupos (Borkent y Spinelli, 2007; Borkent, 2012).

3.4.3. MONTAJE DE *Culicoides* spp.

Las especies de difícil identificación fueron procesadas para su montaje utilizando el protocolo, modificado para ceratopogonidos, de Ibañez-Bernal (2005) (ANEXO 3).

3.4.4. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS

Para la identificación de algunas especies se tomaron en cuenta diversas medidas o proporciones, las cuales se incluyen en la diagnosis e identificación de los *Culicoides* (Huerta, 2002) (ANEXO 4).

3.5. TERCERA ETAPA

Una vez establecido las especies y las características morfológicas de los *Culicoides* spp. presentes en la granja se realizó un periodo de captura más. Asimismo, se obtuvo muestra de sangre de los ovinos en tubos con anticoagulante.

3.5.1. CAPTURA E IDENTIFICACIÓN DE *Culicoides* ADULTOS PARA LA DETECCIÓN DEL ARN VIRAL DE VLA

Se realizaron capturas de insectos en el mes de Octubre de 2017, utilizando cinco trampas de luz succionadoras tipo mini CDC con luz ultravioleta (BELTEC, Perú). Las trampas fueron operadas durante dos días consecutivos, desde el anochecer (18:00 hrs) hasta el amanecer (6:00 hrs) del día siguiente. Estas fueron ubicadas en las ramas de los árboles a una altura de 1.5 - 2 m del suelo en las proximidades del área de descanso de los ovinos y separadas al menos en 50 m.

Los insectos capturados fueron llevados al IVITA-Pucallpa para su colección e identificación, se diferenció *Culicoides insignis* en base a la presencia de la pigmentación de la vena R-M y de la prolongación de la vena R3 para diferenciarla de las demás especies, utilizando un estereoscopio. Luego se realizó pools de 100 mosquitos hembras (Goffredo y Meiswinkel, 2004), por especie (*Culicoides insignis* y otros) en crioviales de 2 ml. Finalmente los viales fueron conservados en nitrógeno líquido hasta su procesamiento en el LMP-SV de la FMV-UNMSM.

3.5.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE DE OVINO CON ANTICOAGULANTE PARA LA DETECCIÓN DEL ARN VIRAL DE VLA

Simultáneamente a la captura de insectos, se obtuvo muestras de 15 ovinos para el análisis molecular. Las muestras de sangre de ovino fueron obtenidas por punción de la vena cefálica o yugular utilizando un tubo con anticoagulante (EDTA). Las muestras fueron conservadas en viales a -20°C hasta su procesamiento.

3.5.3. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL A PARTIR DE *Culicoides* spp. Y SANGRE DE OVINO

La extracción del ARN de los *Culicoides* capturados y de sangre de ovino (Cuadro 11) fue realizado empleando el Kit comercial NORGEN'S Total RNA Purification siguiendo las instrucciones del fabricante

Cuadro 11. Total de pools o muestras para la extracción de ARN total

Especie	Nº de individuos	Nº de pool /muestras
<i>C. insignis</i>	1000	10
<i>Culicoides</i> spp.	100	1
Ovinos	15	15

En el caso de los mosquitos, antes de realizar el proceso de extracción, fueron machacados en un mortero y pilon añadiendo nitrógeno líquido, luego se homogenizó con 1.5ml de PBS (pH: 7.4). Se centrifugó el machacado a 7500rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró en membrana de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0.22µm. La suspensión obtenida y la sangre de ovino fueron utilizadas para la extracción de ARN total, siguiendo las instrucciones del fabricante (NORGEN, Canadá) (ANEXO 5).

3.5.4. SINTESIS DE ADNc

El ARN total extraído tanto de *Culicoides* y de sangre de ovinos fue utilizado como templado para la síntesis de ADNc empleando el Kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) y el cebador antisentido (Cuadro 14). Previamente se desnaturó 5ul del ARN extraído a 97°C por 5 min. y luego fue mantenido a 4°C por 5 minutos.

Luego se preparó el master mix para la reacción de transcripción reversa de la siguiente manera (Cuadro 12):

Cuadro 12. Master Mix GoScript™ Reverse Transcription System

Componente	por muestra	Conc. Final
Agua libre de nucleasas	0.8ul	--
GoScript™ 5X Reaction Buffer	2.0ul	1X
MgCl ₂ 25mM	1.2ul	3mM
PCR Nucleotide Mix 10mM	0.5ul	0.5mM
GoScript™ Reverse Transcriptase	0.2ul	--
Primer reverso BTV-S7-1.R (20uM)	0.4ul	0.8uM
Volumen de mix por muestra	5.0ul	--

Se dispensó 5.0ul del mix a cada tubo de ARN denaturado (volumen final de 10ul). Las muestras fueron llevadas al termociclador donde se siguió el siguiente protocolo de retrotranscripción: 25°C por 5 minutos, 42°C durante 45 minutos y luego 4°C por 5 minutos.

3.5.6. PCR y PCR ANIDADO

El ensayo de PCR y PCR anidado fue realizado empleando el KIT comercial GoTaq® Colorless (Promega) y los cebadores específicos que amplifican el Segmento 7 que codifica la proteína VP7 de VLA, el primer par de cebadores amplifican un producto de 1156pb y el segundo par de 1070pb (Cuadro 13).

Para la primera PCR, la elaboración del master mix siguió las instrucciones del fabricante (ANEXO 6) con 0.8 µM de cada cebador BTV-S7-1F y BRV-S7-1R (Cuadro 14). Las condiciones para la amplificación de los cebadores fueron 95°C durante 5 minutos como

desnaturación inicial seguido de 40 ciclos de 95°C durante 40° segundos , 44°C durante 1 minuto y 72°C por 2 minutos, y una extensión final de 72° C por 10 minutos.

Cuadro 13. Secuencia de cebadores utilizados para el PCR anidado para la detección del segmento 7 de VLA

Identificación del oligo	Longitud (pb)	Secuencia (5' - 3')	Amplicon (pb)	Fuente
BTv-S7-1F	22	GTT AAA AAT CTA TAG AGA TGG A	1156	Modificado de Shaw <i>et al.</i> , 2007
BTv-S7-1R	23	GTA AGT GTA ATY TMA GAG ACG TT		
BTv-S7-2F	21	AGA GAT GGA CAC TAT CGC WGC	1070	En este estudio
BTv-S7-2R	19	ACC CGT GCA AAG TGG ACT A		

*pb: Pares de bases

Para el PCR anidado, también se siguió las instrucciones del fabricante (ANEXO 7) con 0.8 µM del segundo par de cebadores BTv-S7-2F y BRV-S7-2R (Cuadro 14), se utilizó 5 µl del ADN amplificado de la primera PCR. Las condiciones para la amplificación de los cebadores fueron 95°C durante 5 minutos como desnaturalización inicial seguido de 40 ciclos de 95°C durante 40° segundos, 54°C durante 1 minuto y 72°C por 2 minutos, y una extensión final de 72° C por 10 minutos.

Todos los productos de PCR fueron analizados por medio de electroforesis en gel de agarosa (1.5% de agarosa en 0.5X TBE) por 1 hora y teñido con bromuro de etidio para su posterior visualización por irradiación UV.

3.6. ANÁLISIS DE INFORMACIÓN

Se obtuvo la frecuencia de seropositividad de cada granja dividiendo el total de animales positivos a VLA entre el total de animales evaluados multiplicado por 100%.

Para los *Culicoides* spp. identificado se obtuvo el porcentaje de abundancia relativa de cada especie obtenida dividiendo el número de individuos identificados por especie sobre el total de *Culicoides* spp. multiplicado por 100%.

IV. RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS SEROLÓGICO

De las 46 muestras de suero de ovinos 23 (50%) presentaron anticuerpos contra el grupo Orbivirus mediante la prueba de IDGA (Cuadro 14) y 22 (96%) de las muestras positivas a Orbivirus por IDGA fueron anticuerpos contra el virus de Lengua Azul detectado mediante ELISA de competición (Cuadro 15). La frecuencia de animales seropositivos en las granjas fue de 46.7; 81.3 y 20%.

Cuadro 14. Frecuencia de ovinos de pelo (n=46) seropositivos mediante IDGA, por granja.

Procedencia	IDGA			
	nº animales	Positivos	Negativos	%
GRANJA 1	15	7	8	46,7
GRANJA 2	16	13	3	81.3
GRANJA 3	15	3	12	20.0
TOTAL	46	23	23	50

IDGA: Inmunodifusión en gel agar

Cuadro 15. Frecuencia de ovinos de pelo (n=23) seropositivos mediante ELISAc, por granja

Procedencia	ELISAc			
	n° animales	Positivos	Negativos	%
GRANJA 1	7	6	1	85.7
GRANJA 2	13	13	0	100
GRANJA 3	3	3	0	100
TOTAL	23	22	1	96

ELISAc: ELISA de competencia

4.2 IDENTIFICACIÓN DE *Culicoides* spp.

Se colectaron 7930 especímenes del género *Culicoides*, de los cuales 7839 (98.9%) individuos fueron hembras y 91 (1.1%) fueron machos. Los *Culicoides* hembras pertenecieron a 5 especies del subgénero *Hoffmania*: *C. insignis* (n=7430), *C. foxi* (n=251), *C. pseudodiabolicus* (n=22), *C. ocumarensis* (n=100) y *C. hylas* (n= 1); y 1 especie sin subgénero: *C. leopoldoi* (n=1) (Cuadro 16, Fig. 28). Asimismo, se observó a *Culicoides lutzi*, nuevo registro en Perú también del subgénero *Hoffmania* (Fig. 29 y 30)

Cuadro 16. Especies de *Culicoides* spp, capturado de granjas de ovinos de Pucallpa Ucayali, 2016

Subgénero	Grupo	Especie	Machos	Hembras	Total	
			n	N	n	%
Hoffmania Fox, 1948	Guttatus	<i>C. insignis</i>	89	7430	7519	94.8
		<i>C. foxi</i>	1	251	252	3.2
		<i>C. ocumarensis</i>	1	100	101	1.3
		<i>C. pseudodiabolicus</i>	0	25	25	0.3
		<i>*C. lutzi</i>	0	31	31	0.4
	Hylas	<i>C. hylas</i>	0	1	1	0.01
Sin subgénero	Fluvialis	<i>C. leopoldoi</i>	0	1	1	0.01
Total			91 (1.1%)	7839 (98.9%)	7930	

*Nuevo registro en Perú

Del total de especies de *Culicoides* identificados la especie con mayor abundancia relativa fue *C. insignis* (94.8%), seguido de *C. foxi* (3.2) y *C. ocumarensis* (1.3%); otras especies del mismo grupo con escasos ejemplares fueron *C. pseudodiabolicus* y *C. lutzi*; asimismo solo se observó un individuo tanto del grupo Hylas y Fluviales (Cuadro 19)







<i>Culicoides</i> del subgénero Hoffmania	
Grupo Guttatus	
<i>Culicoides insignis</i> Lutz, 1913	<i>Culicoides foxi</i> Ortiz, 1950
	
<i>Culicoides pseudodiabolicus</i> Fox, 1956	<i>Culicoides ocumarensis</i> Ortiz, 1950
	
Grupo Hylas	
<i>Culicoides hylas</i> Forattini, 1957	
	
Culicoides sin subgénero establecido	
Grupo Fluvialis	
<i>Culicoides leopoldoi</i> Ortiz, 1951	
	

Figura 28. Fotografías de las alas de las especies de *Culicoides* identificadas en granjas de ovinos de Pucallpa, Ucayali (Noviembre, 2016)



Figura 29. Terminalia masculina de *C. ocumarensis* (La flecha señala la presencia de los procesos apicolaterales fusionados y cercanos)

***Culicoides* del subgénero Hoffmania: Grupo guttatus**



Figura 30. Ala y proporción palpal (PR=2.42) de *Culicoides lutzi* (400X)

4.3 DETECCIÓN DEL ARN DEL VIRUS DE LENGUA AZUL

La detección del ARN viral en las muestras de *Culicoides* spp. y muestras de sangre de ovinos fue mediante la prueba de PCR y PCR anidado. El análisis molecular fue realizado a todos los pools de *Culicoides* y 15 muestras de sangre de ovinos (cuadro 11), utilizando dos pares de cebadores específicos para el segmento 7 del genoma del VLA los cuales amplifican un producto de 1156 y 1070pb respectivamente (Cuadro 14). De los 10 pools de *Culicoides insignis* solo en 1 se observó la banda de 1070 pb aprox., mientras que en el pool de otros *Culicoides* sp. no se observó la banda de 1070pb (Fig. 31). Solo en una muestra de sangre de ovino de 15 se observó la banda correspondiente al segmento 7 de VLA (Fig. 31). Determinando que 1 pool de *C. insignis* y 1 muestra de sangre de ovino presentaron el genoma de VLA.

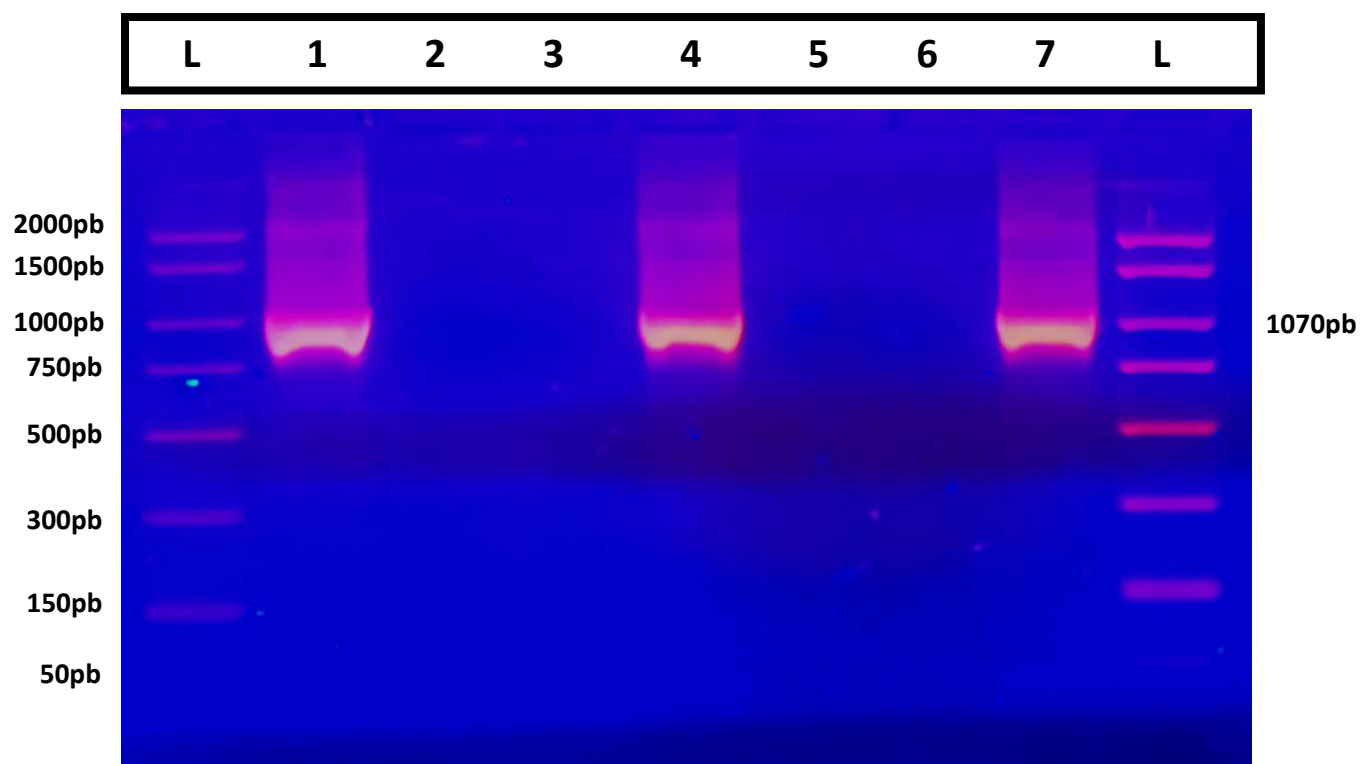


Figura 31. Electroforesis de productos de PCR anidado con cebadores específicos que amplifican el *seg 7* de VLA. Donde: L: Marcador de peso molecular 2000 - 50 bp; 1: control positivo de VLA; 2, 3, 5, 6: blanco; 4: muestra de sangre de ovino; 7: Pool de *Culicoides insignis*

V. DISCUSIÓN

El ecosistema y la presencia de ovinos, caballos, aves de corral en el lugar de estudio fueron condiciones favorables para la presencia y actividad de los mosquitos como lo indican Mellor (2000), Purse *et al.* (2015), entre otros. Los ovinos fueron nativos del lugar aunque al parecer provinieron de Brasil pues en la década del 80 se importaron ovinos de pelo de Brasil y fueron distribuidos en diversas zonas del trópico central del país (H. Rivera, 2016, Lima comunicación personal). Los ovinos de las granjas eran aparentemente sanos, sin lesiones en los epitelios de la boca y bordes coronarios de las patas. Asimismo las granjas se caracterizaron por la presencia de humedales, charcos, arbustos, heces en descomposición, características geográficas que representan las diferentes zonas de descanso y reproducción de mosquitos (Purse *et al.*, 2015).

Previo a la colección de los mosquitos se realizó el análisis serológico de los ovinos para detectar anticuerpos contra el VLA requisito fundamental para realizar la captura de los insectos en dichos lugares. Para esto se utilizó la prueba de IDGA, la cual mostró una frecuencia del 50% de ovinos seropositivos a anticuerpos contra el grupo Orbivirus (Cuadro 14) y el ensayo de ELISA, solo a los animales positivos (n=23), mostró un 96% de ovinos seroreactores a VLA (Cuadro 15). En América del Sur, anticuerpos contra el VLA han sido detectados en bovinos de Colombia (51.8%), ovinos de Ecuador (8%), Venezuela (94.7%) y Argentina (95%); en diferentes estados de Brasil en ovinos (0.2 a 99.5%), cabras (3.9 a 44.5%), bovinos (0.63 a

59.5), búfalos (25.9% a 93%) y pecaríes (39%) (Legisa *et al.*, 2013). Estos estudios demuestran la presencia y la amplia distribución del VLA en el continente sudamericano, indicando que los ovinos fueron expuestos al virus a través de un insecto vector ya que el VLA requiere de un vector competente para ser transmitido al hospedero (Meiswinkel *et al.*, 2004; Darpel *et al.*, 2011). El desarrollo de los síntomas y signos clínicos de la enfermedad depende si la infección es endémica o no. En el trópico y subtropico la infección se hace endémica por las constantes infecciones y reinfecciones por el virus, como consecuencia los animales presentan anticuerpos y muy rara vez signos clínicos (MacLachlan, 2004; Caporale *et al.*, 2014).

El 98.9% de los 7930 *Culicoides* capturados fueron hembras, y el 1.1% machos (Cuadro 16). Los métodos de captura que utilizan un componente lumínico como atrayente capturan predominantemente hembras nulíparas y paridas, con una proporción de machos del 0 al 5% (Venter *et al.* 2009). Además en el estudio, las trampas fueron ubicadas próximas al grupo de ovinos, lo cual favoreció la captura de hembras por ser hematófagas (Baldet *et al.*, 2008; Baylis 2010; Kirkeby *et al.*, 2013). Los resultados se asemejan a los obtenidos en Brasil (Silva y Carvalho, 2013), Estados Unidos (Gerry y Mullens, 2000), España (Monteys y Saiz, 2003) e Italia (Goffredo *et al.*, 2016); donde se obtuvo porcentajes de hembras entre 91.4% a 99.6%; en los cuales parece claro el hecho de que estas fuentes de luz atraen primordialmente a hembras (Venter y Hermanides 2006), también se señala que esta diferencia se debe a que las hembras recorren mayores distancias en busca de alimento (Mullen y Durden, 2009). En el Perú, solo existen registros de especies de *Culicoides* (Felippe-Bauer *et al.*, 2008), mas no estimaciones de abundancia ni proporciones de hembras en capturas y mucho menos de su asociación a enfermedades que afectan la salud animal y la salud pública. Las especies de *Culicoides* involucrados en la transmisión del VLA han sido identificadas en todos los continentes debido a que dentro de la variedad de las especies de *Culicoides* solo algunas pueden ser vectores competentes de uno o más serotipos del VLA de los 27 conocidos a la fecha (MacLachlan y Mayo, 2013).

Dentro de las especies de *Culicoides* capturados el 94.8% (7519/7930) correspondió a *Culicoides insignis* que se caracteriza por presentar una marcada pigmentación oscura de su vena radial-mediana y de la prolongación de la vena R3 (Fig. 28). La abundancia de *C. insignis* capturados es similar a los de la región amazónica de Brasil, estudios donde se reportan porcentajes como 98.2% al norte (Carvalho *et al.*, 2016) y 86.2% en la amazonia Brasileña (Silva y Carvalho, 2013); así también un 91.8% en Coratei-Paraguay (Ronderos (2003), entre otros, indicando que *C. insignis* es una especie con amplia distribución en el continente americano (Lager, 2004) y que al parecer está presente en toda la amazonía peruana (Felippe-Bauer *et al.*, 2008). Es una especie también relacionada a la actividad ganadera ya que han sido

colectados en cantidades abundantes en zonas de crianza de ovinos, equinos y mulas (Silva y Carvalho, 2013). Considerando la abundancia de *C. insignis* hembras en las granjas de ovinos y que ha sido demostrado su competencia como vector del VLA (Tanya *et al.*, 1992; Meiswinkel *et al.*, 2007) se podría inferir que *C. insignis* es el responsable de la transmisión del VLA a los ovinos de las granjas; ya que es la especie involucrada en la transmisión del VLA en sureste de los EEUU, el Caribe, América Central y del Sur (MacLachlan *et al.*, 2007)

Otras especies que fueron capturados aunque en menor abundancia fueron *C. foxi* y *C. ocumarensis* relacionados igualmente a actividades ganaderas. La morfología de las hembras de *C. ocumarensis* es semejante a *C. fiarifer*, resultando imposible su identificación en ausencia de machos capturados (Spinelli, 1999). Para esto se realizó el montaje del ejemplar capturado (n=1) y se observó los procesos apicolaterales cercanos compatible a *C. ocumarensis* (Fig. 29). La importancia de diferenciarlos es que *C. filarifer* es otro vector del VLA en Sudamérica (Meiswinkel *et al.*, 2007). La correcta identificación de las diferentes especies de *Culicoides* y en particular de *C. insignis* es de suma importancia porque es una especie presente desde Florida en USA, América Central, Región del Caribe y América del Sur (Macklanchlan *et al.*, 2007) y que debido al cambio climático podrían estos insectos ampliar su rango de distribución altitudinal (Lorca-Oró *et al.*, 2014), hacia zonas de mayor altitud constituyendo un riesgo para el desarrollo de la ganadería andina en general.

Otra especie identificada fue *C. pseudodiabolicus*, que es una especie relacionada a la presencia de humanos en la cuenca Amazónica (Borkent, 2015) y es que en las dos granjas habitan los guardianes con sus familias. También se registro a *C. hylas* y *C. leopoldoi*, con solo un ejemplar capturado y *C. lutzi*, que es un nuevo registro en Perú. La identificación de este último se basó en la presencia de sólo una mancha clara en su celda mediana, sin pigmentación de la vena r-m, apices de las vena M1, M2, Cu1 claras y de la Cu2 oscura (Fig. 30), forma ligeramente hinchada del tercer segmento del palpo, así como poseer la punta del halterio oscuro (Spinelli *et al.*, 1993), también se consideraron proporciones morfométricas como la proporción palpal (PR = 2.42) (Fig. 30), distinguiéndose de *C. batesi* y *C. flavivenulus*, mosquitos presentes en la amazonia de Brasil. Esta especie ha sido descrita de América central, Colombia, Guyana francesa, en varios estados de Brasil y en el sureste de Argentina (Spinelli *et al.* 2009, de Sousa Farias *et al.*, 2016).

Solo un pool de *Culicoides insignis* mostró una banda de 1070pb (Fig. 31), lo cual indica que esta especie es el vector de VLA en esta región. Se ha señalado que *C. insignis* es una especie con amplia distribución en América del Sur y el Caribe (Lager, 2004), y que es

posiblemente el principal vector de VLA en este continente (Meiswinkel *et al.*, 2007). Por otro lado, uno factor que haya contribuido a la detección de VLA en un pool de *Culicoides* podría ser el bajo índice de infección del VLA en estos mosquitos (Gerry *et al.*, 2001). No existen reportes sobre el índice o tasa de infección natural de algún serotipo del VLA en *C. insignis* capturados, sin embargo un estudio de infección experimental de *C. insignis* con dos serotipos distintos del VLA demostró que la tasa de infección con el serotipo 2 fue de 45 a 62.5% y con el serotipo 11 de 20 a 60% (Tanya *et al.*, 1002). Otro estudio similar a nivel de campo con *C. sonorensis*, otro vector del VLA en América del Norte, América Central y la región del Caribe, encontró que el índice de infección del serotipo 10 del VLA fue de 0.4% en un periodo de tres años con variaciones en un lapso de 4 semanas de 0.0 a a 2.2%, en zonas donde la enfermedad de Lengua Azul es mayormente de tipo subclínico (Gerry *et al.*, 2001), situación muy similar al Perú donde existen animales seropositivos pero no enfermedad clínica. Así mismo, el estudio de McDermott *et al.* (2015) demuestra factores como las trampas con luz UV utilizados para la captura de *C. sonorensis*, lugares de ubicación de los instrumentos de captura, épocas del año son factores que pueden influenciar en la ausencia o bajo porcentaje de detección del ARN viral. Los resultados de estos estudios indican que multiples factores podrían dificultar la detección del VLA a partir de los mosquitos vectores, condiciones que deben ser identificados para una correcta implementación de monitoreos y vigilancia de enfermedades transmitidas por vectores.

Dentro de los muchos factores que afectan la capacidad vectorial de los insectos, la temperatura es la que más influye en su longevidad, duración del ciclo gonotrófico, tamaño y diversidad de la población adulta, número de generaciones y la tasa de supervivencia del vector (Mullens *et al.*, 2004; Carvalho y Silva, 2014; Purse *et al.*, 2015). Tabachnick (2010) lista varios posibles efectos del clima sobre los vectores y sus posibles influencias sobre la transmisión de enfermedades, es así que el incremento de la temperatura influye directamente sobre la capacidad vectorial, la cual puede ser mayor al disminuir el tamaño del ciclo gonotrófico, el periodo intrínseco de incubación del virus e incrementar la supervivencia y la abundancia estacional de una determinada especie. Un ejemplo es *C. brevitarsis* el cual posee baja competencia vectorial, es decir la habilidad del vector para soportar la replicación viral es baja, sin embargo debido a que posee un alto índice de picadura por día es un importante vector de VLA en Australia; mientras *C. fulvus*, aunque es más competente, posee una capacidad vectorial baja, sobre todo por su abundancia y distribución geográfica, lo cual disminuye su potencial de transmisión (Mullens *et al.*, 2004).

Al igual que en el análisis molecular de *Culicoides* solo en un ovino se detectó ARN de VLA. Cabe mencionar que este es el primer reporte de VLA en ovinos de Perú, ya que hasta la fecha sólo habían reportes serológicos (Rosadio *et al.*, 1984; Rivera *et al.*, 1987; Rivera *et al.*,

2013). Esto es posiblemente a que en el ovino el periodo de viremia raramente persiste por más de 14 días, a diferencia del bovino cuyo viremia puede ser de hasta 90-120 días (Alvarez *et al.*, 2017). En América del Sur el ARN viral ha sido identificado en muestras de tejidos de ovinos en forma experimental en Argentina, Guyana y Brasil (Legisa *et al.*, 2013). En este último, con un ecosistema similar a la amazonia peruana, han ocurrido brotes de la enfermedad clínica de lengua azul en ovinos de Paraná (Clavijo *et al.*, 2002) y en Rio de Janeiro (Alvarez *et al.*, 2014), entre los signos clínicos descritos fueron letargia, hipermotilidad intestinal, pirexia, edema facial e hiperemia, pequeñas ulceraciones en la lengua y laminitis. (Clavijo *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2014). Asimismo, cervidos neotropicales en cautiverio han manifestado la enfermedad de lengua azul en Brasil (Kawanami, 2016).

La enfermedad de lengua azul es conocida desde más de 100 años cuando afectó al ovino merino introducido a Sudáfrica. Desde la mitad del siglo 20 su distribución es global excepto en la Antártida, su amplia distribución e impacto en la ganadería justificó para ser incluida en la Lista A de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (MacLachlan, 2011). La enfermedad es endémica principalmente en el trópico y subtrópico porque está asociada a la abundancia de mosquitos vectores. Hasta la fecha en el Perú no ha sido reportada la enfermedad clínica, ya que posiblemente la Cordillera de los Andes constituye una barrera para el avance del VLA hacia el este del país debido a que las condiciones climáticas no son adecuadas para el desarrollo del ciclo biológico de los *Culicoides* spp. (Puntel *et al.*, 1998; Legisa *et al.*, 2013). Sin embargo, el cambio climático y calentamiento global, migración de personas con sus animales domésticos susceptibles, los fuertes vientos e inundaciones pueden favorecer la ampliación del rango geográfico de los mosquitos hacia el norte o sur, tal como ha ocurrido en países europeos desde 1998 -2009. Estudios epidemiológicos indican que los *Culicoides* vectores del VLA fueron transportados por los vientos desde el norte de África hacia Europa mediterránea donde la enfermedad causó severos brotes con cuantiosas pérdidas económicas (Meiswinkel *et al.*, 2008; Purse *et al.*, 2015).

El Perú puede ser uno de los países con mayores riesgos para la emergencia de enfermedades transmitidos por arbovirus ya que posee diversos ecosistemas propicios para el desarrollo de *Culicoides*, los cuales podrían encontrar una población de ovinos u otros rumiantes susceptibles a VLA. Al igual que muchos países en el mundo se considera necesario la determinación de la seroprevalencia del VLA en zonas ganaderas, identificar los diversos serotipos presentes en el Perú, levantar un mapa de la ubicación de las diversas especies de *Culicoides* spp. en las diferentes áreas geográficas y altitudes, determinar las zonas endémicas e incursivas del VLA, determinar los factores de riesgo, entre otros, son aspectos que requieren ser

estudiados en prevención de enfermedades no solo de Lengua azul sino también de otras enfermedades emergentes transmitidas por mosquitos vectores.

VI. CONCLUSIONES

Culicoides insignis fue la especie de mayor abundancia con 94.8% (7519/7930) en áreas cercanas de granjas de ovinos en Pucallpa. Otras especies de *Culicoides* identificadas aunque en menor abundancia fueron: *C. foxi* y *C. ocumarensis* y *C. pseudodiabolicus*. Se reporta a *Culicoides lutzi* como nuevo registro en Pucallpa, Ucayali.

Se determinó la presencia del ARN del VLA en 1 pool de *C. insignis* y en una muestra de sangre de ovino de pelo seropositivo al VLA.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Anderson J. (1984). Use of monoclonal antibody in a blocking ELISA to detect group specific antibodies to bluetongue virus. *J Immunol Methods* 74: 139–149.
2. Anthony S, Jones H, Darpel KE, Elliott H, Maan S, Samuel A. 2007. A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes. *J Virol Methods* 41:188–197.
3. Anthony SL, Maan N, Maan S, Sutton G, Attoui H, Mertens PPC. 2009. Genetic & phylogenetic analysis of the outer capsid proteins VP2 and VP5 of epizootic haemorrhagic disease virus (EHDV). *Virus Research* 145: 200-210.
4. Alvarez MF, Amaral PC, da Silva R, Zandonadi F. 2017. Língua azul: desmistificando a doença." *Revista Acadêmica: Ciência Animal* 15 (2): 21-31.
5. Alvarez MF, dos Santos M, Del Fava C, Ribeiro G, Pituco EM, Zandonadi F. 2014, Outbreak of Bluetongue virus serotype 4 in dairy sheep in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 26 (4): 567-570.
6. Aradaib IE, Smith WL, Osburn BI, Cullor JS. 2003. A multiplex PCR for simultaneous detection and differentiation of North American serotypes of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses. *Comp immunol microbiol infect Dis* 26(2): 77-87.

7. Aradaib IE, Mellor PS, Savini G, Wilson WC. 2009. Scientific Opinion on Epizootic Hemorrhagic Disease 1 EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). European Food Safety Authority 7: 167.
8. Augot D, Sauvage F, Jouet D, Simphal E, Veuille M, Couloux A. 2010. Discrimination of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. Infection, Genetics and Evolution 10: 629–637.
9. Baldet T, Delecolle JC, Cetre-Sossah C, Mathieu B, Meiswinkel R, Gerbier G. 2008. Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the Bluetongue virus (BTV) affected region of northern France during autumn 2006. Preventive Veterinary Medicine 87 (1-2): 84-97.
10. Baldet T, Delécolle JC, Mathieu B, De La Rocque S, Roger F. 2004. Veterinaria Italiana 40(3): 226-231.
11. Balenghien, T. 2008. *Culicoides chiopterus*: Confirmation of its status as potential vector of Bluetongue virus in Europe. International Society for Infectious Diseases 162(3):422
12. Barnard DR, Jones RH. 1980. Diel and seasonal patterns of flight activity of *Ceratopogonidae* in Northeastern Colorado: *Culicoides*. Environmental Entomology 9(4): 446-451.
13. Baylis M, Hasnaoui H, Bouayoune J, Touti J. 1997. The spatial and seasonal distribution of African Horse Sickness and its potential *Culicoides* vectors in Morocco. Medical and Veterinary Entomology 11(3): 203-212.
14. Baylis M, Meiswinkel R, Venter GJ 1998. A preliminary attempt to use climate data and satellite imagery to model the abundance and distribution of *Culicoides imicola* (Diptera: *Ceratopogonidae*) in southern Africa. Journal of the South African Veterinary Association 70: 80-89.
15. Beer M, Conraths FJ, Van der Poel WHM. 2013. Schmallenberg virus—a novel *Orthobunyavirus* emerging in Europe. Epidemiology and infection 141(1): 1-8.
16. Bhattacharya B, Noad RJ, Roy P. 2007. Interaction between bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress. Virol J 4(7): 1-12.

17. Billinis C, Koumbati M, Spyrou V, Nomikou K, Mangana O, Panagiotidis CA, Papadopoulos O. 2001. Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription-PCR: a comparison with conventional methods. *J Virol Methods* 98: 77-89.
18. Blackwell A. 2004. Biting Midges, *Culicoides* Spp.(Diptera: Ceratopogonidae). En: Capinera JL. *Encyclopedia of Entomology*. Florida: Springer Netherlands. p 312-318.
19. Blackwell A. 2004. A morphological investigation of *Culicoides* spp. biting midges (*Diptera: Ceratopogonidae*) from the Caribbean. *Journal of Vector Ecology* 29(1): 51-61.
20. Borkent A, Spinelli GR. 2007. Neotropical *Ceratopogonidae* (Diptera: Insecta) Sofia, Bulgaria: Pensoft. 199pp.
21. Boyce M, Celma CCP, Roy P. 2012. Bluetongue virus non-structural protein 1 is a positive regulator of viral protein synthesis. *Virol J* 29(9): 178-189.
22. Braverman Y, Frish K, Reis M, Mumcuoglu KY. 2012. Host preference of *Culicoides* spp from Israel based on sensory organs and morphometry (*Diptera: Ceratopogonidae*). *Entomologia Generalis* 34(2): 97- 110.
23. Braverman Y, Mumcuoglu K. 2009. Newly emerged nulliparous *Culicoides imicola* (kieffer) (*Diptera: Ceratopogonidae*) with pigmented abdomen. *Veterinary Parasitology* 160: 356-358.
24. Bréard E, Sailleau C, Coupier H, Mure-Ravaud K, Hammoumi S, Gicquel B, Hamblin C, Dubourget P, Zientara S. 2003. Comparison of genome segments 2, 7 and 10 of bluetongue viruses serotype 2 for differentiation between field isolates and the vaccine strain. *Vet Res* 34: 777-789.
25. Cagienard A, Griot C, Mellor PS, Denison E, Stärk KDC. 2006. Bluetongue vector species of *Culicoides* in Switzerland. *Medical and Veterinary Entomology* 20: 239- 247.
26. Campbell CH, St George TD.1986. A preliminary report of a comparison of epizootic haemorrhagic disease viruses from Australia with others from North America, Japan and Nigeria. *Australian Veterinary Journal* 63(7):233.
27. Capela R, Sousa C, Pena I, Caeiro V. 1993. Preliminary note on the distribution and ecology of *Culicoides imicola* in Portugal. *Medical and Veterinary Entomology* 7: 23-26.

28. Caporale M, Di Gialleonorato L, Janowicz A, Wilkie G, Shaw A, Savini G, Van Rijn PA, Mertens P, Di Ventura M, Palmarini M. 2014. Virus and host factors affecting the clinical outcome of bluetongue virus infection. *Journal of virology* 88(18) : 10399-10411.
29. Carpenter S, Wilson A, Mellor, PS. 2009. *Culicoides* and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends microbiol* 17(4): 172-178.
30. Carvalho LPC, Silva FS. 2014. Seasonal abundance of livestock-associated *Culicoides* species in northeastern Brazil. *Medical and veterinary entomology*, 28(2): 228-231.
31. Carvalho LPCD. 2016. Fauna de culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) do Estado de Rondônia, Brasil. Tesis para obter el grado de Magister en Entomologia. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas de la Amazonia. 108p.
32. Chandler JA, Highton RB. 1975. The succession of mosquito species (Diptera: Culicidae) in rice fields in the Kisumu area of Kenya, and their possible control. *Bulletin of Entomological Research* 65: 295-302.
33. Clavijo A, Sepulveda L, Riva J, Pessoa-Silva M, Tailor-Ruthes A, Lopez JW. 2002. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *Vet Rec* 151: 301–302.
34. Coetzee P, Stokstad M, Venter E-H, Myrmel M, van Vuuren M. 2012. Bluetongue: a historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa. *Virol J* 9(1):198.
35. Da Rosa JF, de Souza WM, de Paula Pinheiro F. 2017. Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. *Am J Trop Med Hyg* 96(5):1019-1030.
36. Darpel KE, Batten CA, Veronesi E, Shaw AE, Anthony S, Bachanek-Bankowska K, Kgosana L, Bin-Tarif A, Carpenter S, Müller-Doblies UU, Takamatsu HH. 2007. Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *The Veterinary record*, 161(8): 253-261.
37. Darpel KE, Langner KF, Nimtz M, Anthony SJ, Brownlie J, Takamatsu HH, Mellor PS, Mertens PP. 2011. Saliva proteins of vector *Culicoides* modify structure and infectivity of bluetongue virus particles. *PloS one*, 6(3): p.e17545.

38. De Deken G, Madder M, Deblauwe I, De Clercq K, Fassotte C, Losson B, Haubruge E, De Deken R. 2008. Vector monitoring at Belgian outbreak sites during the Bluetongue epidemic of 2006. *Preventive Veterinary Medicine* 87: 64-73.
39. De Liberato C, Purse BV, Goffredo M, Scholl F, Scaramozzino P. 2003. Geographical and seasonal distribution of the bluetongue virus vector, *Culicoides imicola*, in central Italy. *Medical and veterinary entomology*, 17(4): 388-394.
40. de Sousa Farias E, Almeida JF, Pessoa FA. 2016. List of *Culicoides* biting midges (*Diptera: Ceratopogonidae*) from the state of Amazonas, Brazil, including new records. *Check List*. 12(6): 1- 27.
41. Dyce AL. 1969. The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (*Diptera: Ceratopogonidae*) without dissection. *Australian Journal of Entomology* 8: 11-15.
42. Elbers AR, Backx A, Meroc E, Gerbier G, Staubach C, Hendrickx G, Van Der Spek A, Mintiens K. 2008. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006. I. Detection of the first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine* 87(2): 21-30.
43. Elbers ARW, Koenraadt CJ, Meiswinkel R. 2015. Mosquitoes and *Culicoides* biting midges: vector range and the influence of climate change. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz* 34(1): 123-137.
44. Elbers ARW, Meiswinkel R. 2015. *Culicoides* (*Diptera: Ceratopogonidae*) and livestock in the Netherlands: comparing host preference and attack rates on a Shetland pony, a dairy cow, and a sheep. *Journal of Vector Ecology* 40(2): 308-317.
45. Elhassan AM, Mansour ME, Shamon AA, El Hussein AM. 2014. A serological survey of Akabane virus infection in cattle in Sudan. *ISRN veterinary science* 2014:123904.
46. Felipe-Bauer M, Pinto C, Py-Daniel V, Spinelli G. 2009. *Culicoides baniwa* sp.nov. from the Brazilian Amazon Region with a synopsis of the hylas species group (*Diptera: Ceratopogonidae*). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(6): 851-857.
47. Felipe-Bauer ML, Cáceres AG, Santos da Silva C, Valderrama-Bazan W, Gonzales-Perez A, Martins J. 2008. New records of *Culicoides* Latreille (*Diptera: Ceratopogonidae*) from Peruvian Amazonian region. *Biota Neotropica* 8(2): 33-38.

48. Felipe-Bauer ML, Cáceres AG, Silva CS, Valderrama-Bazan W, Gonzales-Perez A. 2003. Two new *Culicoides* of the *paraensis* species group (*Diptera: Ceratopogonidae*) from the Amazonian region of Peru. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 1051-1058.
49. Forzan M, Marsh M, Roy P. 2007. Bluetongue virus entry into cells, *J. Virol.* 81:4819–4827.
50. Forzan M, Wirblich C, Roy P. 2004. A capsid protein of nonenveloped bluetongue virus exhibits membrane fusion activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2100–2105.
51. Foster NM, Luedke AJ, Parsonson IM, Walton TE. 1991. Temporal relationships of viremia, interferon activity, and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus strains. *Am J Vet Res.* 52:192–196.
52. Gerry AC, Mullens BA. 2000. Seasonal abundance and survivorship of *Culicoides sonorensis* (*Diptera: Ceratopogonidae*) at a southern California dairy, with reference to potential bluetongue virus transmission and persistence. *J. Med. Entomol.* 37:675–88
53. Gerry AC, Mullens BA, MacLachlan NJ, Mecham OJ. 2001. Seasonal transmission of bluetongue virus by *Culicoides sonorensis* (*Diptera: Ceratopogonidae*) at a southern California dairy and evaluation of vectorial capacity as a predictor of bluetongue virus transmission. *J. Med. Entomol.* 38:197–209.
54. Gibbs EP, Homa EJ, Mo CL, Greiner EC, Gonzalez J, Thompson LH, Oveido MI, Walton TE, Yuil TMI. 1992. Epidemiology of bluetongue viruses in the American tropics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 653(1): 243-250.
55. Goffredo M, Meiswinkel R. 2004. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: Methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Veterinaria Italiana* 40: (3) 260-265.
56. Goffredo M, Meiswinkel R, Federici V, Di Nicola F, Mancini G, Ippoliti C, Di Lorenzo A, Quaglia M, Santilli A, Conte A, Savini G. 2016. The '*Culicoides* obsoletus group' in Italy: relative abundance, geographic range, and role as vector for Bluetongue virus. *Veterinaria italiana* 52(3):235-241.
57. Gonzalez M, Goldarazena A. 2011. El género *Culicoides* en el País Vasco. Guía Práctica para su identificación y control. España: Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. 247 pp.

58. Gorchs C, Lager I. 2001. Lengua Azul Actualización sobre el Agente y la Enfermedad. Rev Argent Microbiol. 33(2): 122-132.
59. Gorman BM. 1986. Evolutionary relationships among orbivirus. Rev Sci Tech Off Int Epiz 5: 323-332.
60. Greiner EC, Mo CL, Homan EJ, Gonzalez J, Oviedo MT, Thompson LH, Gibbs EP. 1993. Epidemiology of bluetongue in Central America and the Caribbean: initial entomological findings. Medical Veterinary Entomology 7(4): 309-315.
61. Grocock CM, Campbell CH. 1982. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. Can J Comp Med 46: 160-164.
62. Gumm ID, Taylor WP, Roach CJ, Alexander FC, Greiner EC, Gibbs EP. 1984. Serological survey of ruminants in some Caribbean and South American countries for type-specific antibody to bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses. Vet Rec 114: 635-638.
63. Harrup LE, Bellis GA, Balenghien T, Garros C. 2015. *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) taxonomy: Current challenges and future directions. Infection, Genetics and Evolution 30: 249-266.
64. Hassan SH, Wirblich C, Forzan M, Roy P. 2001. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP5 protein: role in cellular permeabilization. J Virol 75:8356-8367.
65. Hassan SS, Roy P. 1999. Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. J Virol 73:9832-9842.
66. Hoffmann B, Scheuch M, Höper D, Jungblut R, Holsteg M, Schirrmeier H 2012. Novel Orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011. Emerg Infect Dis 18:469-472.
67. Homan EJ, Taylor WP, Lorbacher de Ruiz H, Yuill TM. 1985. Bluetongue virus and epizootic haemorrhagic disease of deer virus serotypes in northern Colombian cattle. J Hyg (Lond) 95: 165-172.
68. Howell PG, Verwoerd DW. 1971. Bluetongue virus En Gard S, Hallaver C, Meyer KF. Virology monographs Vol. 9 New York: Springer Verlag. p 35-74 .
69. Huerta H. 2002. Ceratopogonidae (Diptera: Ceratopogonidae) de las reservas de ría Lagartos y Ría Celestún, Yucatán, México. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. México D.F: Universidad Nacional Autonoma de México. 134 pp.

70. Hunter P. 2003. Climate change and waterborne and vector-borne disease. *J Appl Microbiol* 94: 37-46.
71. Ibañez S. 2005. *Phlebotominae* (Diptera: Psychodidae) de México. V.-Clave ilustrada para la identificación de los machos de *Lutzomyia* França. *Folia Entomologica Mexicana* 44 (1): 49-66.
72. [INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2012. IV Censo Nacional Agropecuario 2012. [Internet]. Disponible en: <http://proyectos.inei.gob.pe/web/DocumentosPublicos/ResultadosFinalesIVCENAGRO.pdf>
73. Kawanami AE. 2016. Vírus da língua azul em cervídeos neotrópicos e bovídeos domésticos. Tesis para optar el grado de Doctor en Medicina Veterinaria. Universidad Estadual Paulista. 99p.
74. Kirkeby C, Græsboll K, Stockmarr A, Christiansen LE, Bodker R. 2013. The range of attraction for light traps catching *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasites and vectors*, 6(1): 67.
75. Kline D, Axtell R. 1999. Sensilla of the Antennae and Maxillary Palps of *Culicoides hollensis* and *C. melleus* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology* 36(4): 493-502.
76. Kono R, Hirata M, Kaji M, Goto Y, Ikeda S, Yanase T, Yamakawa M. 2008. Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan. *BMC veterinary research* 4(1): 20.
77. Kramer WL, Greiner EC, Gibbs EPJ. 1985. Seasonal variations in population size, fecundity, and parity rates of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Florida, USA. *Journal of medical entomology* 22(2): 163-169.
78. Kramer WL, Jones RH, Holbrook FR, Walton TE, Calisher CH. 1990. Isolation of arboviruses from *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Colorado during an epizootic of vesicular stomatitis New Jersey. *Journal of Medical Entomology* 27: 487- 493.
79. Kurogi H, Akiba K, Inaba Y, Matumoto M. 1987. Isolation of akabane virus from the biting midge *Culicoides oxystoma* in Japan. *Veterinary Microbiology* 15(3): 243–248.
80. Lage AP, Castro RS, Melo MI, Aguiar PH, Barreto Filho JB, Leite RC. 1996. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea/mucosal

disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 49: 195–197.

81. Lager IA. 2004. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Vet Ital* 40: 89-93.
82. Legisa D, Gonzalez F, De Stefano G, Pereda A, Dus Santos MJ. 2013. Phylogenetic analysis of bluetongue virus serotype 4 field isolates from Argentina. *The Journal of General Virology* 94(3): 652–662.
83. Legisa, DM, Gonzalez FN, Santos MJD. 2013. Bluetongue virus in South America, Central America and the Caribbean. *Virus research*, 182: 87-94.
84. Lelli R, Ventura M, Mercante MT, Tittarelli M, Mangana-Vougiouka O, Nomikou, Conte A. Bluetongue laboratory diagnosis: a ring test to evaluate serological results using a competitive ELISA kit. *Vet Ital* 40(4): 577-580.
85. Lopez WA, Nicoletti P, Gibbs EP. 1985. Antibody to bluetongue virus in cattle in Ecuador. *Trop Anim Health Prod* 17(2): 82.
86. Lorca-Oró C, López JR, Ruiz F, Acevedo P, García I, Oleaga Á, Pujols J. 2014. Long Term Dynamics of Bluetongue Virus in Wild Ruminants: Relationship with Outbreaks in Livestock in Spain. *PloS one* 9(6): e100027.
87. Maan S, Maan NS, Samuel AR, Rao S, Attoui H, Mertens PP. 2007. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *J Gen Virol* 88:621–630.
88. MacLachlan NJ, Zientara S, Stallknecht DE, Boone JD, Goekjian VH, Sailleau C, Balasuriya UB. 2007. Phylogenetic comparison of the S10 genes of recent isolates of bluetongue virus from the United States and French Martinique Island. *Virus research*, 129(2): 236-240.
89. MacLachlan NJ, AJ Guthrie. 2010. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other Orbivirus diseases. *Vet Res* 41: 35.
90. MacLachlan NJ, Guthrie AJ. 2010. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. *Vet Res* 41(35): 1-12.

91. Maclachlan NJ, Mayo CE. 2013. Potential strategies for control of bluetongue, a globally emerging, *Culicoides*-transmitted viral disease of ruminant livestock and wildlife. *Antivir. Res.* 99:79–90
92. Maclachlan NJ, Osburn BI. 2008. Induced brain lesions in calves infected with bluetongue virus. *Veterinary Record* 162: 490- 491.
93. MacLachlan NJ. 2004. Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Vet Ital* 40: 462-467.
94. Maclachlan NJ, Osburn BI. 2004. Epizootic haemorrhagic disease of deer. *Infectious diseases of livestock* 2: 1227-1230.
95. Maclachlan NJ, Drew CP, Darpel KE, Worwa G. 2009. The pathology and pathogenesis of bluetongue. *Journal of comparative pathology.* 141(1):1-6.
96. McDermott EG, Mayo CE, Gerry AC, Laudier D, MacLachlan NJ, Mullens BA. 2015. Bluetongue virus infection creates light averse *Culicoides* vectors and serious errors in transmission risk estimates. *Parasites & vectors*, 8(1): 460.
97. Meiswinkel R., Gomulski LM, Delecolle JC, Goffredo M, Gasperi G. 2004. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes - unfinished business. *Vet Ital* 40 (3): 151-159.
98. Meiswinkel R, Van Rijn PA, Leijds P, Goffredo M. 2007. Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Veterinary Record*, 161(16): 564-565.
99. Meiswinkel R, Baldet T, De Deken R, Takken W, Delécolle JC, Mellor PS. 2008. The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe—the entomological perspective. *Preventive veterinary medicine*, 87(1): 55-63.
100. Mehlhorn H, Walldorf V, Klimpel S, Jahn B, Jaeger F, Eschweiler J, Beer M. 2007. First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitology research*, 101(1): 219-228.
101. Mellor PS, Boorman J, Baylis M. 2000. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 45:307–340.
102. Mellor PS. 1993. African horse sickness: transmission and epidemiology. *Vet Res* 24: 199-212.

103. Meroc E, Herr C, Varheyden B, Hooyberghs J, Haudart P, Raemaekers M, Vandenbussche F, De Clerq K, Mintiens K. 2009. Bluetongue in Belgium: episode II. *Transbound Emerg Dis* 56: 3948.
104. Mertens PP, Burroughs JN, Walton A, Wellby MP, Fu H, O'Hara RS. 1996. Enhanced infectivity of modified bluetongue virus particles for two insect cell lines and for two *Culicoides* vector species. *Virology* 217:582–593.
105. Mertens PPC, Attoui H, Duncan R, Dermody TS. 2005. Reoviridae. En *Virus* Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses London: Elsevier/Academic Press. p 447-454.
106. Mihn Hoan, T. 2010. Contribution a l'étude des Ceratopogonidae de nouveau monde: le genre *Culicoides* Latreille, 1809 (*Diptera: Ceratopogonidae*) morphologie, importance médicale et vétérinaire, description des espèces de la Guyane Française. Tesis para obtener el grado de magister. Paris: Université Paris. 80 pp.
107. Ministerio del Ambiente. La Conservación de Bosques en el Perú. 2016. Programa Nacional de Conservación de Bosques para la Mitigación del Cambio Climático. Editado por Ministerio del Ambiente, Oficina de Comunicaciones. Primera Ed. Pag 29.
108. Miranda MA, Borràs D, Rincón C. 2004. Seasonal abundance of *Culicoides imicola* and *C. obsoletus* group in the Balearic Islands (Spain). *Veterinaria Italiana* 40: 292-295.
109. Monteys VSI y Saiz-Ardanaz M. 2003. *Culicoides* midges in Catalonia (Spain), with special reference to likely bluetongue virus vectors. *Medical and veterinary entomology*, 17(3): 288-293.
110. Mullen GR y Durden LA. 2009. *Medical and veterinary entomology*. 2 ed. Academic Press. 647 pp.
111. Mullens BA, Gerry AC, Lysyk TJ, Schmidtman ET. 2004. Environmental effects on vector competence and virogenesis of bluetongue virus in *Culicoides*: interpreting laboratory data in a field context. *Vet Ital*, 40(3): 160-166.
112. Mullens BA, McDemott EG, Gerry AC. 2015. Progress and Knowledge gaps in *Culicoides* ecology and control. *Vet Ital*. 51(4): 313-323.
113. Narladkar BW, Deshpande PD, Shivpuje PR. 2006.. Bionomics and life cycle studies on *Culicoides* sp. (*Diptera: Ceratopogonidae*). *Journal of Veterinary Parasitology* 20(1): 7-12.

114. Ninio C, Augot D, Delecolle J.C, Dufour B, Depaquit J. 2011. Contribution to the knowledge of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences in France. Parasitology Research 108(3): 657-663.
115. Ninio C, Augot D, Dufour B, Depaquit J. 2011. Emergence of *Culicoides obsoletus* from indoor and outdoor breeding sites. Veterinary Parasitology 183(2): 125-129.
116. Nunes MR, Martins LC, Rodrigues SG, Chiang JO, da Silva Azevedo RD, da Rosa AP, da Costa Vasconcelos PF. 2005. Oropouche virus isolation, Southeast Brazil. Emerging Infectious 11(10):1610-1614.
117. Patakakis MJ. 2004. *Culicoides imicola* in Greece. Veterinaria Italiana 40 (3): 232- 234.
118. Patel A, Roy P. 2014. The molecular biology of Bluetongue virus replication. Virus research 182: 5-20.
119. Pearson JE, Carbrey EA, Gustafson GA. 1985. Bluetongue and related orbivirus diagnosis in the United States. Prog Clin Biol Res 178: 469-475.
120. Perie PP, Chermette R, Millemann Y, Zientara S. 2005. Les *Culicoides*, Diptères hématophages vecteurs de la fièvre catarrhale du mouton. Bull. Acad Vét France 158(3): 213-224.
121. Perruolo GJ. 2009. Clave de las especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) asociadas con la ganadería en la región Neotropical. Revista Científica 19(2): 124-133.
122. Pinheiro FP, Hoch AL, Gomes ML, Roberts DR. 1981. Oropuche virus. IV. Laboratory transmission *Culicoides paraensis*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 30: 172-176.
123. Puntel M, Fondevila NA, Blanco Viera J, O'Donnell VK, Marcovecchio JF, Carrillo BJ, Schudel AA. 1999. Serological survey of viral antibodies in llamas (*Lama glama*) in Argentina. Zentralbl Veterinarmed B 46: 157–161.
124. Purse BV, Mellor PS, Rogers DJ, Samuel AR, Mertens PP, Baylis M. 2005. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. Nat Rev Microbiol 3(2): 171-181.
125. Purse,B, Brown HE, Harrup L, Mertens P, Rogers D. 2008. Invasion of bluetongue and other orbivirus infections into Europe: the role of biological and climatic processes. Rev Sci Tech 27(2): 427-442.

126. Purse BV, Carpenter S, Venter GJ, Bellis G, Mullens BA. 2015. Bionomics of temperate and tropical *Culicoides* midges: knowledge gaps and consequences for transmission of *Culicoides*-borne viruses. Annual review of entomology 60: 373-392.
127. Rawlings P, Mellor PS. 1994. African horse sickness and the overwintering of *Culicoides* spp. in the iberian peninsula. Revue Scientifique Et Technique De l'Office International Des Epizooties 13: 753-761.
128. Rawlings P, Snow WF, Boorman J, Denison E, Hamblin C, Mellor PS. 1998. *Culicoides* in relation to transmission of African Horse Sickness virus in the Gambia. Medical and Veterinary Entomology 12: 155-159.
129. Rawlings P. 1996. A key, based on wing patterns of biting midges (Genus *Culicoides* Latreille-Diptera: *Ceratopogonidae*) in the Iberian peninsula, for use in epidemiological studies. Graellsia 52: 52-71.
130. Rieb JP. 1982. Contribution à la connaissance de l'écologie et de la biologie des cératopogonidés (Diptera: Nematocera). Tesis Doctoral en Ciencias Naturales Université Louis Pasteur de Strasbourg. 395p.
131. Ristow S, Leendersten L, Gorham J, Yilma T. 1988. Identification of a neutralizing epitope shared by bluetongue virus serotypes 2 and 13. J Virol 62: 2502-2504.
132. Rivera H, Cárdenas L, Ramírez M, Manchego A, More J, Zúñiga A, Romero M. 2013. Infección por orbivirus en huanganas (*Tayassu pecari*) de Madre de Dios. Rev Investig vet Perú 24(4): 544-550.
133. Rivera H, Madewell BR, Ameghino E. 1987. Serological survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (*Lama vicugna*). Am J Vet Res 48: 189-191.
134. Ronderos, M.M., Greco, N.M., Spinelli, G.R., 2003. Diversity of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: *Ceratopogonidae*) in the area of the Yacyreta Dam Lake between Argentina and Paraguay. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 19-24.
135. Rosadio RH, Evermann JF, DeMartini JC. 1984. A preliminary serological survey of viral antibodies in Peruvian sheep. Vet Microbiol 10: 91- 96.
136. Roy P. 2008. Bluetongue virus: dissection of the polymerase complex. Journal of general virology 89(8): 1789-1804.

137. Ruder MG, Lysyk TJ, Stallknecht DE, Foil LD, Johnson DJ, Chase CC, Dargatz DA, Gibbs EP. 2015. Transmission and epidemiology of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease in North America: Current perspectives, mresearch gaps, and future directions. *Vector Borne Zoonotic Dis* 15(6): 348–363.
138. Samy AM, Peterson AT. 2016. Climate change influences on the global potential distribution of bluetongue virus. *PloS one*. 11(3):e0150489.
139. Sánchez-Vizcaíno JM. 2004. Control and eradication of African horse sickness with vaccine. *Dev Biol* 119: 255-258.
140. Savini G, Afonso A, Mellor P, Aradaib I, Yadin H, Sanaa M, Wilson W, Monaco F, Domingo M. 2011. Epizootic haemorrhagic disease. *Research in Veterinary Science* 91(1): 1-17.
141. Scacchia M, Lelli R, Peccio A, Di Mattia T, Mbulu RS, Hager AL, Monaco F, Savini G, Pini A. 2009. African horse sickness: a description of outbreaks in Namibia. *Vet Ital* 45: 265-274.
142. Schwartz-Cornil I, Mertens PP, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Bréard E, Zientara S. 2008. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary research* 39(5): 1-16.
143. Shaw AE, Monaghan P, Alpar HO, Anthony S, Darpel KE, Batten CA, Guercio A, Alimena G, Vitale M, Bankowska K, Carpenter S. 2007. Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. *Journal of virological methods* 145(2): 115-126.
144. Sellers RF, Mellor PS. 1993. Temperature and the persistence of viruses in *Culicoides* spp. during adverse conditions. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 12(3): 733-755.
145. Shelley AJ, Coscarón S. 2002. Simuliid blackflies (Diptera: Simuliidae) and ceratopogonid midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of *Mansonella ozzardi* (Nematoda: Onchocercidae) in Northern Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 451-458.
146. Silva FS, Carvalho LPC. 2013. A population study of the Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in urban, rural, and forested sites in a cerrado area of Northeastern Brazil. *Annals of the Entomological Society of America*, 106(4): 463-470.

147. Smith H, Mullens BA. 2003- Seasonal activity, size, and parity of *Culicoides occidentalis* (Diptera: Ceratopogonidae) in a coastal southern California salt marsh. Journal of Medical Entomology 40: 352-355.
148. Spinelli G, Ronderos M, Díaz F, Marino P. 2005. The bloodsucking biting midges of Argentina (Diptera: Ceratopogonidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 100(2): 137-150.
149. Spinelli GR, Borkent A. 2004. New species of Central American *Culicoides* Latrelii (Diptera: Ceratopogonidae) with synopsis of species from Costa Rica. Proc Entomol Soc Wash 106(2): 361-395
150. Spinelli GR, Greiner EC, Wirth WW. 1993. The neotropical bloodsucking midges of the *Culicoides guttatus* group of the subgenus Hoffmania (Diptera: Ceratopogonidae). Contr. Am. Entomol. Inst. 27(3):1-91.
151. Spinelli GR, Greiner EC, Wirth WW. 1993. The Neotropical bloodsucking midges of the *Culicoides guttatus* group of the subgenus Hoffmania (Diptera: Ceratopogonidae). Contributions of the American Entomological Institute 27: 1-91.
152. Stallknecht DE, Howerth EW. 2004. Epidemiology of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease in wildlife: surveillance methods. Veterinaria Italiana 40(3): 203-207.
153. Swanson D. 2012. Ecology and phylogeny of the biting-midge genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). Tesis para optar el grado de Doctor en Entomología. Carolina del Sur: Clemson University. 194pp.
154. Tabachnick WJ. 1996. *Culicoides variipennis* and bluetongue-virus epidemiology in the United States. Annu Rev Entomol 41: 23-43.
155. Tabachnick WJ. 2010. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistystems in a changing world. Journal of Experimental Biology, 213(6): 946-954.
156. Tamayo R, Schoebitz R, Alonso O, Wenzel J. 1985. First report of bluetongue antibodies in Chile. Prog Clin Biol Res. 178: 555-558.
157. Tanya VN, Greiner EC, Gibbs EPJ. 1992. Evaluation of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus. Veterinary microbiology, 32(1): 1-14.

158. Tatem AJ, Baylis M, Mellor PS, Purse BV, Capela R, Pena I, et al. 2003. Prediction of bluetongue vector distribution in Europe and North Africa using satellite imagery. *Vet Microbiol* 97: 1329.
159. Tesh RB. 1994. The Emerging Epidemiology of Venezuelan hemorrhagic Fever and Oropouche fever in Tropical South America. *Annals New York Academy of Sciences* 740: 129-137.
160. Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. 2007. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J Virol Methods* 140 (2): 115-23.
161. Toussaint JF, Vandenbussche F, Mast J, De Meester LAO, Goris N, Van Dessel W, Vanopdenbosche E, Kerkhofs P, De Clercq K, Zientara S, Sailleau C. 2006. Bluetongue in northern Europe. *Vet Rec*: 159(10): 327.
162. Van Den Brom R, Luttikholt SJM, Lievaart-Peteron K, Peperkamp NHMT, Mars MH, Van Der Poel WHM. 2012. Epizootic of ovine congenital malformations associated with Schmallenberg virus infection. *Tijdschr Diergeneeskde* 137:106–111.
163. Vandenbussche F, Vanbinst T, Verheyden B, Van Dessel W, Demeestere L, Houdart P, Bertels G, Praet N, Berkvens D, Mintiens K, Goris N, De Clercq K. 2008. Evaluation of antibody-ELISA and real time RT-PCR for the diagnosis and profiling of bluetongue virus serotype 8 during the epidemic in Belgium in 2006. *Vet Microbiol* 129 (2): 15-27.
164. Vende P, Piron M, Castagné N, Castagne N. 2000. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3'end. *J Virol* 74: 7064–7071.
165. Venter GJ, Hermanides KG. 2006. Comparison of black and white light for collecting *Culicoides imicola* and other livestock-associated *Culicoides* species in South Africa. *Veterinary parasitology*, 142(3): 383-385.
166. Venter GJ, Labuschagne K, Hermanides KG, Boikanyo SNB, Majatladi DM, Morey L. 2009. Comparison of the efficiency of five suction light traps under field conditions in South Africa for the collection of *Culicoides* species. *Veterinary Parasitology* 166: 299-307.
167. Venter GJ, Meiswinkel R. 1994. The virtual absence of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) in a light-trap survey of the colder, high-lying area of the eastern Orange

Free State, South Africa, and implications for the transmission of arboviruses. The Onderstepoort Journal of Veterinary Research 61 (4): 327-340.

168. Veronesi E, Darpel KE, Hamblin C, Carpenter S, Takamatsu HH, Anthony SJ, Elliott H, Mertens PP, Mellor PS. 2010. Viraemia and clinical disease in Dorset Poll sheep following vaccination with live attenuated bluetongue virus vaccines serotypes 16 and 4. Vaccine, 28(5): 1397-1403.
169. Wilson WC, Ma HC, Venter EH, Van Dijk AA, Seal BS, Mecham JO. 2000. Phylogenetic relationships of bluetongue viruses based on gene S7. *Virus research* 67(2): 141-151.
170. Wilson AJ, Mellor PS. 2009. Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364(1530): 2669-2681.
171. Wirth W, Dyce A, Spinelli G. 1988. An Atlas of Wing Photographs: With a Summary of the Numerical Characters of the Nearctic Species of *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) American Entomological Institute. 72pp.
172. Wirth WW, Blanton FS. 1956. Studies in Panama *Culicoides* (Diptera, Heleidae). Two new species related to leoni Barbosa and reevesi Wirth. *Bulletin of the Brooklyn Entomological Society* 51: 45–52.
173. Zientara S, Sailleau C, Dauphin G, Roquier C, Remond EM, Lebreton F, Hammoumi S, Dubois E, Agier C, Merle G, Bréard E. 2002. Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *Vet Rec* 150: 598-601
174. Zimmer JY, Haubrage E, Francis F. 2014. Review: larval ecology of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 18(2): 301-312.
175. Zimmer JY, Saegerman C, Losson B, Haubrage E. 2010. Breeding sites of Bluetongue virus vectors, Belgium. *Emerging Infectious Diseases* 16(3): 575-657.

VIII. ANEXOS

**ANEXO 1: PROTOCOLO DE INMUNODIFUSIÓN EN GEL AGAR (IDGA), según el
KIT COMERCIAL DE VMRD**

- 1.-** Preparar agarosa (0.9%) suspendido en una solución de 0.85% de NaCl.
- 2.-** Dispensar 15 ml de la agarosa en placas petri de 100 por 15 mm, dejar solidificar a temperatura ambiente
- 3.-** Una vez solidificado el agar, realizar los nueve agujeros o pocillos
- 4.-** Dispensar 20 μ L de antígeno (Bluetongue Virus Antigen A) en el posillo del centro y 20 μ L del antisuero (Positive Reference Serum R) en los pocillos periféricos de forma alternada, dejando tres pocillos vacíos para las muestras.
- 5.-** Adicionar a los pocillos vacíos 20 μ L de las muestras e incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 48 horas.
- 6.-** Realizar las lecturas a las 24 hrs y 48 hrs, la presencia de líneas de precipitación indican reacción antígeno-anticuerpo.

ANEXO 2: PROTOCOLO DE cELISA

Todos los reactivos deber ser puestos a temperatura ambiente (18-25°C) antes de ser utilizados.

- 1.-** Añadir 25 µL de los controles positivo y negativo a los pocillos apropiados. Utilizará diferente punta de pipeta para cada control.
- 2.-** Añadir 25 µL de la muestra de suero en los pocillos seleccionados empleando diferente punta de pipeta para cada muestra. 3
- 3.-** Cubrir la microplaca con papel parafina y mezclar en el agitador para microplacas. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente (23±2°C).
- 4.-** Adicionar 25 µL del anticuerpo conjugado a cada pocillo. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente (23±2°C).
- 5.-** Lavar la microplaca con aproximadamente 300 µL del Wash concentrado o solución de lavado cuatro veces. Aspire los contenidos líquidos de todos los pocillos después de cada lavado. En la última lavada eliminar bien el fluido restante golpeando enérgicamente sobre un papel toallero o cualquier material absorbente.
- 6.-** Añadir 50 µL de la solución sustrato a cada pocillo e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente (23±2°C), evite la luz directa. El tiempo es registrado a partir del llenado del primer pozo.
- 7.-** Al cabo de 10 minutos añadir 100 µL de la solución de parada o solución stop, para detener la reacción, a cada pocillo y mezclar cuidadosamente.
- 8.-** Agregar 50 µL de solución stop en el mismo orden de adición del sustrato en el paso 7.
- 9.-** Medir la densidad óptica (DO) de los controles y muestras a 650 nm en el espectrofotómetro. Se recomienda limpiar bien la base o los bordes de la microplaca antes de realizar la lectura en el espectrofotómetro.
- 10.-** Calcular la media de los valores de absorbancia (ver cálculos) para cada muestra y para los controles.
- 11.-** Las muestras son positivas si producen una densidad optica menor al 50% de la media del control negativo. Las muestras son negativas si producen una densidad optica mayor o igual al 50% de la media del control negativo

ANEXO 3: PROTOCOLO DE MONTAJE DE CERATOPOGONIDOS

1. Mantener los ejemplares por 2 a 4 horas en solución jabonosa al 5%.
2. Realizar un lavado en agua destilada por 10 minutos.
3. Separar las alas desde la base del cuerpo y colocarlas en etanol al 70% por 10 minutos, ir al paso (e).
4. El resto del cuerpo transferir para su maceración en NaOH (10%) durante 24 horas, ir al paso (h).
5. Colocar las alas en etanol absoluto por 3 minutos.
6. Diafanizar en esencia de clavo por al menos 10 minutos.
7. Proceder a realizar el montaje de las alas en Euparal.
8. Al día siguiente, sellar con euparal y cubreobjetos las alas. Transferir el cuerpo del *Culicoides* en agua destilada por 15 minutos.
9. Realizar pasajes para su deshidratación en etanol al 70 y 96% por 10 minutos y luego en etanol absoluto por 3 minutos.
10. Diafanizar en esencia de clavo por al menos 10 minutos.
11. Proceder a realizar el montaje del cuerpo con balsamo de Canadá sobre un cubreobjetos.
12. Diseccionar el cuerpo separa la cabeza y el abdomen del tórax.
13. Acomodar la cabeza con la superficie posterior hacia el cubreobjetos con las antenas y palpos extendidos hacia abajo. El cuerpo se coloca con el lado izquierdo hacia abajo con las patas extendidas. En el caso del abdomen su lado ventral es colocado hacia el cubreobjetos.
14. La muestra una vez disecada se deja secar por 24 horas a 37 - 40°C, al cabo del cual se separa el cubreobjetos del portaobjetos, se coloca una pequeña gota de euparal y se invierte el cubreobjetos para terminar la preparación.
15. Dejar secar por al menos 1 semana a 37 - 40°C.

ANEXO 4. MORFOMETRIA DE *Culicoides* spp.

1. Longitud del ala (WL): Medida desde el arculo hasta el extremo apical del ala.
2. Proporción costal (CR): Es la longitud total de la vena costal, medida desde el arculo hasta el extremo terminal de la segunda celda radial, dividido entre la WL.
3. Proporción antenal (AR): Es la suma de la longitud de los cinco flagelomeros distales (9-13) divididos entre la suma de la longitud de los primeros ocho flagelomeros (1-8). En machos se mide (10-13 entre 1-9).
4. Proporción palpal (PP): Es la longitud del tercer segmento del palpo dividido entre la anchura máxima del mismo segmento.
5. Longitud de la probóscide/cabeza (P/HR): La proporción se obtiene por la división de la longitud de la proboscide medida desde la torma al extremo apical del labro entre la distancia que existe de la torma al pelo medio que se encuentra entre los ojos.
6. Proporción tarsal (TR): Se obtiene por la división de la longitud del primer tarsomero entre la longitud del segundo de la misma pata.
7. Patrón antenal de las sensilas celónicas: Se toma en cuenta la presencia de las sensilas en cada uno de los flagelomeros.

ANEXO 5: PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Para las muestras de sangre de ovino empezar desde el paso 2 y en el caso de *Culicoides* desde el 1.

1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE *Culicoides* spp. : Las muestras de pools de *Culicoides* hembras están conservadas en nitrógeno líquido.

- 1.1** Transferir los mosquitos a un mortero
- 1.2** Machacar los insectos con el pilón y agregar, cuidadosamente, nitrógeno líquido.
- 1.3** Adicionar 1.5 ml de PBS estéril y homogenizar
- 1.4** Transferir el machacado a un tubo de centrifuga
- 1.5** Centrifugar a 7500 rpm por 10 min a 4 °C.
- 1.6** Filtrar el sobrenadante en una membrana de 0.22µm de poro a un vial de 2 ml.

2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE LISIS

- 2.1** Agregar 350ul del Buffer RL a 2 viales por muestra.
- 2.2** Transferir 100ul de la suspensión viral a un tubo de centrifuga por duplicado, y mezclar en vortex por 15seg.
- 2.3** Adicionar 200ul de etanol al 96-100% a cada vial. Mezclar en vortex por 10seg.

3. PURIFICACIÓN:

- 3.1** Transferir 650ul de cada solución lisada dentro de una columna y centrifugar por 1 minuto a 6000RPM.

Nota: Asegurarse de que todo el liquido atraviese la membrana, en caso contrario centrifugar a 14000 RPM por 1 minuto.

- 3.2** Eliminar el líquido y ensamblar nuevamente la columna.

4. LAVADO

- 4.1** Adicionar 400ul de la solución de lavado A y centrifugar a 14000RPM por 1 minuto.
Nota: Asegurarse de que todo el liquido atraviese la membrana, en caso contrario centrifugar a 14000 RPM por 1 minuto.
- 4.2** Eliminar el líquido y reensamblar la columna
- 4.3** Repetir el paso 1 y 2 dos veces más
- 4.4** Centrifugar la columna por 2 minutos a 14000 RPM
- 4.5** Eliminar el tubo de centrifugación y transferir la columna a un tubo de elución.

5. ELUCIÓN

- 5.1** Agregar 20ul de la solución de elución A (56°C) a la columna.
- 5.2** Centrifugar por 2 minutos a 2000RPM seguido de 1 minuto a 14000 RPM.
- 5.3** Eliminar la columna y luego ensamblar la otra columna del duplicado de la muestra y repetir el paso 5.1 y 5.2
- 5.4** Realizar la síntesis de ADNc.

ANEXO 6: PROTOCOLO PARA EL PCR DEL SEGMENTO 7 DEL VIRUS DE AZUL VLA

PARTE 1.

PRIMERS PCR 1 (1156pb)

ID	Secuencia 5'----3'	pb
BTv-S7-1F	GTT AAA AAT CTA TAG AGA TGG A	22
BTv-S7-1R	GTA AGT GTA ATY TMA GAG ACG TT	23

MASTER MIX

1. Elaborar el mix, mezclar y centrifugar cada componente antes de su uso:

Componente	por muestra	Conc. final
Agua libre de nucleasas	5.5ul	--
GoTaq® Colorless Master Mix, 2X	12.5ul	1X
Forward BTv-S7-1F (20um)	1.0ul	0.8uM
Reverse BTv-S7-1R (20um)	1.0ul	0.8uM
Volumen de mix por muestra	20.0ul	--

2. Dispensar 20.0ul del mix a cada tubo de reacción y añadir **5 ul del ADNc (Volumen final de 25ul)**
3. Programar el protocolo de PCR como se detalla:

PROTOCOLO DE PCR

Paso	T °C	Tiempo
1	95.0	5 min.
2. 40 Ciclos	94.0	40 seg.
	44.0	1 min.
	72.0	2 min.
3	72.0	10 min.
4	4.0	infinito

ELECTROFORESIS

1. Preparar el gel de agarosa 100ml (1.5%) en TBE 0.5X
2. Mezclar 5ul de ADN del segundo PCR y 3ul del buffer de carga y añadirlo en el pocillo respectivo
3. Mezclar 3ul del marcador de peso de carga (PM) con 3ul del buffer de carga y añadirlo en el pocillo respectivo
4. Programar la fuente de energía a 90V por 2.0 hrs.

ANEXO 7: PROTOCOLO PARA EL PCR ANIDADO DEL SEGMENTO 7 DEL VIRUS DE AZUL VLA

PARTE 2.

PRIMERS PCR 2 (1070pb)

ID	Secuencia 5'----3'	pb
BTV-S7-2F	AGA GAT GGA CAC TAT CGC WGC	21
BTV-S7-2R	ACC CGT GCA AAG TGG ACT A	19

MASTER MIX

1. Elaborar el mix, mezclar y centrifugar cada componente antes de su uso:

Componente	por muestra	Conc. final
Agua libre de nucleasas	5.5ul	--
GoTaq® Colorless Master Mix, 2X	12.5ul	1X
Forward BTV-S7-2F (20um)	1.0ul	0.8uM
Reverse BTV-S7-2R (20um)	1.0ul	0.8uM
Volumen de mix por muestra	20.0ul	--

2. Dispensar 20.0ul del mix a 2 tubos de reacción por muestra y añadir **5 ul del ADN amplificado del primer PCR puro y otro diluido en 1/10 (Volumen final de 25ul)**
3. Programar el protocolo de PCR como se detalla:

PROTOCOLO DE PCR

Paso	T °C	Tiempo
1	95.0	5 min.
2. 40 Ciclos	94.0	40 seg.
	54.0	1 min.
	72.0	2 min.
3	72.0	10 min.
4	4.0	infinito

ELECTROFORESIS

1. Preparar el gel de agarosa 100ml (1.5%) en TBE 0.5X
2. Mezclar 5ul de ADN del segundo PCR y 3ul del buffer de carga y añadirlo en el pocillo respectivo
3. Mezclar 3ul del marcador de peso de carga (PM) con 3ul del buffer de carga y añadirlo en el pocillo respectivo
4. Programar la fuente de energía a 90V por 2.0 hrs.